

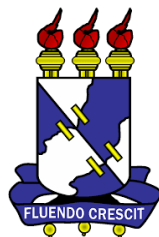
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ELUCIDAÇÃO DA INTERAÇÃO HÓSPEDE-HOSPEDEIRO
ENTRE R-(-)-CARVONA E β -CLICLODEXTRINA

ANTONIO GUILHERME DE CAVALHO NETO

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ELUCIDAÇÃO DA INTERAÇÃO HÓSPEDE-HOSPEDEIRO
ENTRE R-(-)-CARVONA E β -CLICLODEXTRINA

ANTONIO GUILHERME DE CARVALHO NETO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Mairim Russo Serafini

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2017

CARVALHO-NETO, ANTONIO
GUILHERME

ELUCIDAÇÃO DA INTERAÇÃO HÓSPEDE-
HOSPEDEIRO ENTRE R-(-)-CARVONA E β -
CLICLODEXTRINA

2017

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Carvalho Neto, Antonio Guilherme de
C331e Elucidação da interação hóspede-hospedeiro entre R-(-)-
carvona e β -ciclodextrina / Antonio Guilherme de Carvalho Neto ;
orientadora Mairim Russo Serafini. – São Cristovão, 2017.
67 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Monoterpenos. 3.
Ciclodextrinas. 4. Carvona. I. Serafini, Mairim Russo, orient. II.
Título.

CDU 615.322:665.52

ANTONIO GUILHERME DE CARVALHO NETO

ELUCIDAÇÃO DA INTERAÇÃO HÓSPEDE-HOSPEDEIRO
ENTRE R-(-)-CARVONA E β -CLICLODEXTRINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____

Orientadora: Prof. Dra. Mairim Russo Serafini

1º Examinador (a): Dra. Patrícia Severino

2º Examinador (a): Dr. José Guedes de Sena Filho

PARECER

RESUMO

Os óleos essenciais (OEs) são compostos extraídos de plantas que dispõem de uma grande variedade de atividades biológicas relatadas na literatura. Nessa classe, destaca-se a carvona, monoterpene cetônico insaturado, encontrado na natureza sob duas formas enantioméricas, a S-(+)-carvona e R-(-)-carvona. A carvona possui diversas propriedades farmacológicas tais como: anticancerígena, anticonvulsivante, ansiolítica, antidepressiva e anti-inflamatória. A R-(-)-carvona apresenta algumas características físico-químicas que limitam sua utilização, como por exemplo, baixa solubilidade em água, elevada volatilização e fácil oxidação. Nessa perspectiva, a formação de complexos de inclusão (CIs) com ciclodextrinas (CDs) têm sido uma das principais estratégias para aumentar a solubilidade em água de fármacos fracamente solúveis contornando suas limitações físico-químicas. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo preparar os complexos R-(-)-carvona/ β -CD na razão molar 1:1 por diferentes métodos de complexação: mistura física (MF), malaxagem (MA), coevaporação (CE), ultrassom (US) e liofilização (LF) caracterizando-os por calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria /termogravimetria derivada (TG/DTG), determinação de umidade por Karl Fischer (KF), espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além disso, o método analítico para quantificação da R-(-)-carvona foi desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eficiência de complexação (EC%) foi determinada a partir desse método. As curvas DSC e TG/DTG dos métodos de CE e LF mostraram respectivamente, o desaparecimento do evento característico de fusão da R-(-)-carvona, e a redução considerável de perda de massa na primeira etapa (Δm_1 6,87% e 5,18% entre 34-150 °C), indicando a complexação. Os resultados de DRX dos CIs (MA, CE e LF) apresentaram o desaparecimento de linhas espectrais características da β -CD e o surgimento de novos picos, sugerindo mudanças na fase cristalina da β -CD. As imagens de MEV dos CIs exibiram mudanças relevantes na morfologia em comparação com a β -CD livre e a MF, apresentando uma diminuição no tamanho das partículas, principalmente nos métodos US e LF. Os resultados de FTIR demonstrou que houve deslocamentos e redução na intensidade das bandas características da R-(-)-carvona nos espectros dos CIs. As análises de CLAE demonstraram que as maiores EC% foram obtidas pelos métodos de CE e LF (70,93% e 84,26%). Assim, conclui-se que os métodos de complexação CE e LF apresentaram os melhores perfis de interação hóspede-hospedeiro, sugerindo a formação dos CIs entre a R-(-)-carvona e a β -CD.

Palavras-Chave: óleos essenciais; monoterpene; carvona; β -ciclodextrina; complexos de inclusão.

ABSTRACT

The essential oils (EOs) are compounds extracted from plants that have a great variety of biological activities reported in the literature. In this class, carvone, an unsaturated ketone monoterpene, is found in nature under two enantiomeric forms: S-(+)-carvone and R-(-)-carvone. Carvone has several pharmacological properties such as anticancer, anticonvulsant, anxiolytic, antidepressant and anti-inflammatory. R-(-)-carvone has some physico-chemical characteristics that limit its use, such as low solubility in water, high volatilization and easy oxidation. In this perspective, the formation of inclusion complexes (ICs) with cyclodextrins (CDs) have been one of the main strategies to increase the solubility in water of poorly soluble drugs, bypassing their physico-chemical limitations. In this way, the present study aimed to prepare the R-(-)-carvone/ β -CD complexes in the 1: 1 molar ratio by different complexation methods: physical mixture (PM), paste complex (PC), slurry complex (SC), ultrasound (US) and freeze drying (FD), characterized by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG), Karl Fischer Moisture Determination (KF), Fourier transform infrared spectrophotometry (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). In addition, the analytical method for quantification of R-(-)-carvone was developed by high performance liquid chromatography (HPLC) and complexation efficiency (CE%) was determined from this method. DSC and TG/DTG curves of the SC and FD methods showed, respectively, the disappearance of the R-(-)-carvone melting characteristic event, and the considerable reduction of mass loss in the first step (Δm_1 6.87% and 5.18% between 34-150 °C), indicating the complexation. XRD results of the ICs (PC, SC and FD) showed the disappearance of spectral characteristic lines of β -CD and the emergence of new peaks, suggesting a change of β -CD crystalline phase. SEM images of ICs exhibited relevant changes in morphology compared to free β -CD and PM, showing a decrease in particle size, especially in the US and FD methods. FTIR results showed that there were displacements and reduction in the intensity of the R-(-)-carvone characteristic bands in the ICs spectra. HPLC analysis showed that the higher CE% were obtained by SC and FD methods (70.93% and 84.26%). Thus, it is concluded that the SC and FD complexation methods presented the best host-guest interaction profiles, suggesting IC's formation between R-(-)-carvone and β -CD.

Keywords: Essential oils; monoterpene; carvone; β -cyclodextrin; inclusion complexes.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Joselito e Luzia e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por iluminar o meu caminho. Minha vida tem sido marcada por realizações diárias, que às vezes não dou o devido valor, mas eu sei que a graça de Deus se faz presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Joselito e Luzia, meu infinito agradecimento. Obrigada por vocês existirem e por serem quem são. Aprendi com vocês a ter coragem, a não desanimar e a ter humildade na caminhada. Sempre acreditaram em minha capacidade e isso só me fortaleceu mais e mais. Obrigada pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos Ana Maria, Moises, Déborah e Vitória, juntos dividimos alegrias e tristezas. Vocês são o melhor presente que nossos pais poderiam ter dado na minha vida.

A minha orientadora Mairim Serafini, obrigado por tudo! Precisamos de mais orientadores como você! Que nos ensine a trilhar os caminhos sempre com humildade, determinação e foco! Você é a melhor!!!

A minha parceira de todos os momentos, sempre me ajudando a montar esse quebra-cabeça, a ilustríssima dona Gaby. Sem ela, eu estaria mais perdido que cego em tiroteio até agora, muito obrigado por você ser quem é!

Aos meus amigos TOPs dos TOPs Valléria, Yasmim, Isla, Taty e Paulinha, agradeço a vocês por todos os melhores momentos que passamos, por aguentarem as minhas agonias e por todo apoio nos momentos difíceis.

A família LeFT, aqui encontrei pessoas que irei levar por toda minha vida, amigos que juntos passamos por poucas e boas, risos e tristezas, sem vocês esse laboratório nunca seria o mesmo. Ao prof. Adriano Antunes, aos pós: Bruno, Saran, Graça, Monna, Caio e aos melhores ICs do DFA Lee, Bruna, Igor, Anny, Bella, Day, Namaria, Livia e Clara. Aos amigos que fiz no DFA, em especial a Carlos, pela amizade.

Aos professores do PPGCF, pelo incentivo e conhecimentos compartilhados durante as disciplinas e atividades, em especial a prof. Cris Walker que me acompanhou durante todos os seminários, aprendi muito com suas contribuições;

A professora Dra. Patrícia Severino, por todo incentivo e sugestões dadas durante as bancas de avaliação, por compartilhar idéias que contribuíram na construção desta dissertação;

Ao professor Dr. José Guedes, pelas contribuições dadas ao trabalho;

A secretaria do PPGCF, em especial a André, pelo apoio durante esse período;

Aos centros de pesquisa FIOCRUZ-BA e ITP-UNIT, pela oportunidade de execução das análises para o desenvolvimento desta dissertação;

A CAPES e FAPITEC-SE, pelo apoio financeiro concedido para a execução deste trabalho;

Ninguém vence sozinho... OBRIGADO A TODOS!

“É impossível ser infeliz no final se você colocar Deus no início...”

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1. Óleos essenciais (OEs).....	19
2.2. Terpenos	21
2.3. Carvona.....	22
2.4. Ciclodextrinas.....	24
2.5. Complexos de inclusão (CIs)	28
2.6. Métodos de caracterização	29
2.6.1 Análise térmica	30
2.6.2 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	30
2.6.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	31
2.6.4 Difração de raios X (DRX)	31
2.6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Geral	32
3.2 Específicos.....	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 Material	33
4.1.1 Reagentes e solventes	33
4.1.2 Equipamentos.....	33
4.2 Métodos	34
4.2.1 Busca de anterioridade.....	34

4.2.2	Obtenção dos complexos de inclusão R-(-)-carvona/ β -CD.....	34
4.3	Caracterização físico-química e morfológica.....	35
4.3.1	Análise térmica	35
4.3.2	Determinação de umidade por Karl Fischer (KF).....	36
4.3.3	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	36
4.3.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
4.3.5	Difração de raios X (DRX)	36
4.4	Desenvolvimento do método analítico para quantificação da R-(-)-carvona por CLAE	37
4.4.1	Condições cromatográficas	37
4.4.2	Desenvolvimento do método	37
4.5	Eficiência de complexação (EC)	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Busca de anterioridade	39
5.2	Caracterização físico-química e morfológica.....	39
5.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	39
5.4	Termogravimetria e termogravimetria derivada (TG/DTG).....	41
5.5	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	43
5.6	Difração de raios X (DRX).....	45
5.7	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
5.8	Desenvolvimento do método analítico para quantificação de R-(-)-carvona por CLAE	48
5.9	Eficiência de complexação (EC%)	50
6	CONCLUSÃO	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Principais grupos de compostos de terpenos de acordo com o número de unidades de isopreno.	22
Tabela 2	Medicamentos disponíveis no mercado mundial contendo β -CD	25
Tabela 3:	Dimensões das ciclodextrinas naturais.	27
Tabela 4:	Percentuais de perdas de massa (TG/DTG) e determinação da quantidade de água (KF) da β -CD, R-(-)-carvona, MF, MA, CE, US e LF.	42
Tabela 5:	Percentuais da eficiência de complexação da MF e dos complexos de R-(-)-carvona/ β -CD.	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura química do isopreno.	21
Figura 2:	Estruturas enantioméricas da carvona.	23
Figura 3:	Estrutura química (a) e a forma toroidal (b) da molécula de β -ciclodextrina.	26
Figura 4:	Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão de ciclodextrina.	28
Figura 5:	Curvas DSC da R-(-)-carvona, β -CD, MF, MA, CE, US e LF, analisadas em atmosfera de N_2 (50 mL min^{-1}), com razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ na faixa de temperatura entre 25 e $500 \text{ }^\circ\text{C}$.	40
Figura 6:	Curvas TG/DTG da R-(-)-carvona, β -CD, MF, MA, CE, US e LF, analisadas em atmosfera de N_2 (100 mL min^{-1}), com razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ na faixa de temperatura entre 25 e $900 \text{ }^\circ\text{C}$.	42
Figura 7:	Espectros de infravermelho da R-(-)-carvona, β -CD, MF, MA, CE, US e LF obtidos em $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.	44
Figura 8:	Difratogramas de raios X da β -CD, MF, MA, CE, US e LF obtidos em 2θ ($3 - 40^\circ$).	45
Figura 9:	Fotomicrografias eletrônicas de varredura da β -CD, MF, MA, CE, US e LF obtidas nos aumentos de 400x e 700x.	47
Figura 10:	Cromatograma da R-(-)-carvona ($100 \text{ } \mu\text{g/mL}$; HPLC; 254 nm).	48
Figura 11:	Curva de calibração da R-(-)-carvona ($5 - 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$).	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDs	Ciclodextrinas
CE	Coevaporação
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EC	Eficiência de complexação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LF	Liofilização
MA	Malaxagem
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
OE	Óleo essencial
RMN	Ressonância magnética nuclear
TG/DTG	Termogravimetria/termogravimetria derivada
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFS	Universidade Federal de Sergipe
US	Ultrassom
β-CD	β-ciclodextrina

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos oriundos de fontes naturais tem uma longa tradição na medicina (CATALANI et al., 2016). De uma forma geral, a natureza tem produzido a maioria das substâncias orgânicas mais importantes, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento e pesquisa de novos fármacos (PANG et al., 2015). Nesse contexto, destacam-se os óleos essenciais, que são compostos extraídos das plantas e dispõem de uma grande variedade de atividades biológicas comprovadas na literatura, tais como: antimicrobiana (KNEZEVIC et al., 2016), analgésica, anti-inflamatória (SARMENTO-NETO et al., 2015), antioxidante (HZOUNDA et al., 2016; DUARTE et al., 2016), antitumoral (GIROLA et al., 2015) e leishmanicida (FARIAS-JUNIOR et al., 2012). Estes efeitos são atribuídos principalmente aos monoterpenos (componentes químicos em maior quantidade nos óleos essenciais perfazendo aproximadamente 90% da composição), sesquiterpenos, fenilpropanoides e outros componentes voláteis (FRANZ et al., 2010; PEREIRA et al., 2014; VERMA et al., 2015; AMARAL-BAROLI et al., 2016; KFOURY et al., 2016).

Neste grupo, destaca-se a carvona, monoterpeno cetônico insaturado, encontrada na natureza sob duas formas enantioméricas: a S-(+)-carvona e R-(-)-carvona (PORTO et al., 2010; PEIXOTO et al., 2015; SOUZA et al., 2013). Esta possui diversas propriedades farmacológicas relatadas na literatura (ESFANDYARI-MANESH et al., 2013; DA ROCHA et al., 2013; MARQUES et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015). Entre elas, atividades anti-inflamatória e a antinoceptiva foram comprovadas por Da Rocha e colaboradores em 2013 e por Marques e colaboradores (2014). Ambos realizaram estudos *in vivo* com compostos sintéticos derivados da carvona, (β -epoxi-carvona e cyane-carvona) demonstrando resultados promissores para o tratamento de dor e inflamação.

No entanto, os monoterpenos apresentam algumas limitações como baixa solubilidade em água, alta volatilidade e instabilidade química que podem limitar suas aplicações (BHAT et al., 2015). Nessa perspectiva, a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (CDs) tem sido discutida na literatura como alternativa promissora para melhorar as propriedades físico-químicas, uma vez que as CDs aumentam a solubilidade em água e a estabilidade química, diminuem a volatilidade e alteram a biodisponibilidade de moléculas pouco solúveis (MENEZES

et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015; OLESEN et al., 2016; MENEZES et al., 2016; OLESEN et al., 2016).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, compostos de unidades de glicose, as mais comumente utilizadas são (α -, β -, e γ -CD) e são formadas por 6, 7 e 8 unidades de D-(+)-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas α -(1-4) (CEBORSKA et al., 2015; GARCÍA et al., 2016; MONTEIL et al., 2017). Das CDs naturais, a β -ciclodextrina (β -CD) é a mais utilizada na área farmacêutica, devido as suas propriedades físico-químicas e pela capacidade de acomodar grupos aromáticos encontrados na maioria dos óleos essenciais.

A importância das CDs e as suas aplicações tem sido relatadas em inúmeros trabalhos e demonstram diversos benefícios na complexação de monoterpenos em β -CD, como: melhora na solubilidade, aumento da biodisponibilidade e estabilidade dos compostos (YULIANI et al., 2006; FANG et al., 2013; SANTOS, E. H., et al., 2015; HIGUERAS et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2015; CEBORSKA et al., 2015).

Diante disso, objetivou-se nesse estudo desenvolver complexos de inclusão R-(-)-carvona/ β -CD por diferentes métodos, caracterizando-os físico-quimicamente e morfologicamente, a fim de elucidar a interação hóspede-hospedeiro. Além disso, o presente trabalho é inovador por também não ter sido encontrado nas bases de dados World Intellectual Property Organization (WIPO), European Patente Office (Espacenet), United States Patent and Trademark Office (USPTO) e Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) depósitos de patentes com o mesmo objetivo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Óleos essenciais (OEs)

As plantas medicinais desempenham um papel importante no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos. A diversidade de espécies resulta em uma grande variedade de metabólitos secundários com estruturas químicas importantes (GUO, 2016). Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis são obtidos a partir de fontes naturais (DUTRA et al., 2016). Nesse contexto, inserem-se os óleos essenciais: compostos aromáticos voláteis extraídos principalmente das plantas que contém uma variedade de substâncias, tais como: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, hidrocarbonetos e ácidos graxos (AZEREDO et al., 2013; FERNANDES et al., 2013; ATANASOV et al., 2015; BADREDDINE et al., 2015; XIAO et al., 2016).

A Organização Internacional para Padronização (OIP) define OE como produto obtido de partes de plantas através do processo de destilação por arraste de vapor d'água e prensagem a frio do fruto (caso específico de frutos cítricos). Os OEs apresentam diversas propriedades terapêuticas relatadas na literatura como: anticancerígena (ASIF et al., 2016; ATASEVER-ARSLAN et al., 2016), antinociceptiva (ANAYA-EUGENIO et al., 2016), antidiabética (JOO et al., 2013), antibacteriana (ULUKANLI et al., 2014; SANTOS et al., 2015; ATARÉS et al., 2016;), melanogênica (AUMEERUDDY-ELALFI et al., 2016), antioxidante (ADEOSUN et al., 2013; TANG et al., 2013; ATARÉS et al., 2016), anti-inflamatória (MOUSSAOUI et al., 2016) e leishmanicida (FARIAS-JUNIOR et al., 2012).

O uso dos OEs tem aumentado em todo o mundo. Uma maior quantidade é produzida para atender a demanda, tais como abastecimento de diversos setores industriais, dentre eles na produção de inseticidas na agricultura utilizado para o controle de pragas e insetos (GONZALEZ et al., 2014; DO et al., 2015), cosméticos nas composições de perfumes (BADREDDINE et al., 2015) e na medicina em diversos produtos farmacêuticos (KOWALSKI et al., 2015; STEFANAKI et al., 2016; CERCEAU et al., 2016).

Nos últimos anos houve um aumento de interesse dos pesquisadores para o desenvolvimento de trabalhos científicos com os óleos essenciais em áreas distintas (JOO et al., 2013; ADEOSUN et al., 2013; TANG et al., 2013; ULUKANLI et al.,

2014; SANTOS et al., 2015; ASIF et al., 2016; XIAO et al., 2016; MOUSSAOUI et al., 2016; DE SOUZA et al., 2016; ZENG et al., 2016; VALCOURT et al., 2016; AUMEERUDDY-ELALFI et al., 2016; LAFHAL et al., 2016; IANNICELLI et al., 2016; ATASEVER-ARSLAN et al., 2016; CERCEAU et al., 2016; LUCIARDI et al., 2016; STEFANAKI et al., 2016; ATARÉS et al., 2016). Entre os diversos estudos realizados, os OEs de plantas do gênero *Mentha* tem recebido uma considerável importância econômica nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos, alimentos e de higiene (DE SOUSA et al., 2016; PATEL et al., 2016).

O gênero *Mentha* (família Lamiaceae – Labiateae) compreende cerca de 30 espécies diferentes (ARUMUGAM et al., 2008). São plantas herbáceas e perenes, de crescimento rápido e fácil, oriundas do Oriente Médio e Europa, que foram trazidas para o Brasil no período colonial (WATANABE et al., 2006). Essas espécies apresentam uma diversidade de composição química de seus óleos essenciais, são reconhecidas popularmente devido as suas inúmeras atividades biológicas para o tratamento de infecções de pele, isquemia cerebral, malária, intoxicação alimentar e bronquite (SHAHBAZI et al., 2016). De acordo com Watanabe e colaboradores (2006) as mais utilizadas pela população são: menta do levante (*Mentha citrata*), hortelã verde (*Mentha spicata*), poejo (*Mentha pulegium*), hortelã crespa (*Mentha crispa*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e hortelã doce (*Mentha arvensis*).

A *Mentha spicata* L. (hortelã verde) contém uma ampla gama de compostos fenólicos, flavonóides, terpenóides e entre outros constituintes (PRAGADHEESH et al., 2015; SHAHBAZI et al., 2016). É considerada a principal fonte de extração do óleo essencial da R-(-)-carvona (KEDIA et al., 2014), além de outros como: limoneno, mentona, mentol, pulegona, dihidrocarveol (PATEL et al., 2016; SHAHBAZI et al., 2016).

Com base na literatura os óleos essenciais da *M. Spicata*, apresentam atividades antimicrobiana (GHAZAGHI et al., 2014; SHAHBAZI et al., 2016), antioxidante (PATEL et al., 2016), anti-inflamatória (PEARSON et al., 2010), antifúngica e antiviral (SHAHBAZI et al., 2015). Estas podem ser atribuídas devido a presença dos terpenos (SHAHBAZI et al., 2016).

2.2. Terpenos

Os terpenos são uma classe de hidrocarbonetos que podem ser produzidos biologicamente, e representam um dos principais componentes dos OEs no qual os monoterpenos são os mais comuns (90% de composição dos óleos essenciais) e os mais explorados pela indústria em geral (HELLIER et al., 2013; NIKOLIĆ et al., 2015). Tais hidrocarbonetos são compostos orgânicos derivados do metabolismo secundário de plantas, caracterizados por possuir o isopreno (C_5H_8 ; Figura 1) que pode ser formado por estruturas acíclica ou cíclica (BAKKALI et al., 2008; NIKOLIĆ et al., 2015; TAN et al., 2016).

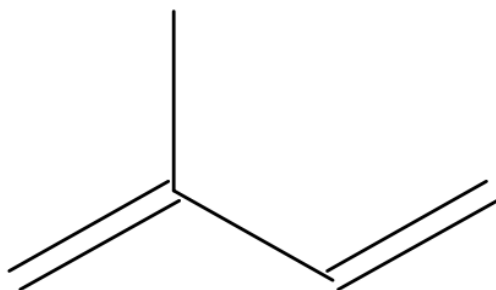


Figura 1. Estrutura química do isopreno (LIN et al., 2013).

Os terpenos são amplamente utilizados na indústria cosmética e alimentícia por suas características antimicrobiana e aromática, enquanto suas outras atividades, tais como: anti-inflamatória, analgésica e antioxidante os tornam moléculas de grande valor terapêutico (MA et al., 2016; SHI et al., 2016). Esses compostos, também denominados terpenóides ou isoprenóides, desempenham um papel de extrema importância na natureza (WU et al., 2016; EMSERMANN et al., 2016). Segundo Yamada e colaboradores (2015), o primeiro estudo relatado na literatura foi no ano de 1891 por Berthelot e André onde detectaram uma substância com odor forte típico da terra. Em 1903, trabalhos químicos realizados por Holleman concluíram que todos os terpenos possuem fórmula geral $C_{10}H_{16}$ (isopreno). Até o momento, estima-se que haja aproximadamente 50.000 metabólitos terpenóides identificados, representando cerca de 400 famílias de estruturas distintas, as quais são encontradas em variedade de fontes naturais, incluindo: frutos, vegetais, microrganismos e plantas (YAMADA et al., 2015).

As plantas tem a capacidade de sintetizar grandes quantidades de diferentes terpenóides, esses, são nomeados de acordo com o número de unidades de isopreno presentes na molécula, tais como podemos observar na Tabela 1. A maioria das estruturas são multicíclicas, o que diferem entre si não são apenas os grupos funcionais, mas também a cadeia básica de carbono (CROTEAU et al., 2000; PUTIGNANI et al., 2013). Os monoterpenos são compostos derivados de duas unidades de isopreno e em geral apresentam odor característico o qual dá o caráter aromático à planta (KŘŮMAL et al., 2015), e atualmente possui grande interesse científico na pesquisa tais como: limoneno (PEIXOTO et al., 2015; MENEZES et al., 2016), carvacrol (SANTOS et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2015), linalol (PEREIRA et al., 2014; DUARTE et al., 2016) e carvona (BHAT et al., 2015; NOGOCEKE et al., 2016; MURUGANATHAN et al., 2016; CASTIGLIONE et al., 2017).

Tabela 1: Principais grupos de compostos de terpeno de acordo com o número de unidades isopreno.

Classificação	Unidades de isopreno
Hemiterpenóides	1
Monoterpenóides	2
Sesquiterpenóides	3
Diterpenóides	4
Triterpenóides	5
Tetraterpenóides	6
Politerpenóides	<i>N</i>

Fonte: Okuniewski et al., 2015.

2.3. Carvona

A carvona (*p*-menta-6,8-dien-2-ona) é um monoterpeno cetônico insaturado representante da classe dos terpenos. Em razão da presença de centro quiral ela pode ser biossintetizada na natureza sob duas formas enantioméricas S-(+)-carvona (*Carum carvi*) e R-(-)-carvona (*Mentha spicata*) (PORTO et al., 2010; PEIXOTO et al., 2015). Estudos *in vivo* realizados com a carvona demonstraram que esse

monoterpeno apresenta diversos efeitos farmacológicos, tais como: anticancerígeno (BHAT et al., 2015), anticonvulsivante (DE ALMEIDA et al., 2008), ansiolítico, antidepressivo (MORA et al., 2005) e antimicrobiana (CASTIGLIONE et al., 2017).

Kang e colaboradores (2016) evidenciaram em estudo realizado utilizando a R-(-)-carvona e S-(+)-carvona que ambos enantiômeros ativaram os canais de receptores de potencial transitório (TRPs), vaniloide (TRPV1) e ANKTM1 (TRPA1), respectivamente, resultando num aumento da liberação espontânea de L-glutamato para os neurônios da substância gelatinosa com quase a mesma eficácia. Nogoceke e colaboradores (2016) avaliaram o efeito da R-(-)- e S-(+)-carvona (Figura 2) em modelos animais de um episódio maníaco, e os resultados demonstraram que a administração aguda e crônica de ambos foram efetivos em bloquear a hiperlocomoção induzida por privação de sono ou por psicoestimulantes (metilfenidrato), sugerindo um potencial efeito antimaníaco deste monoterpeno.

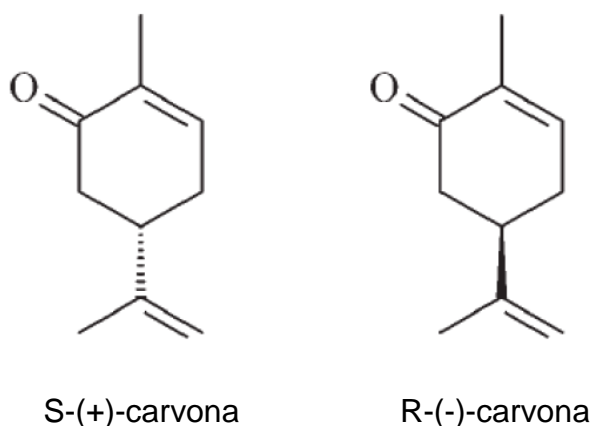


Figura 2: Estruturas enantioméricas da carvona.

De acordo com Da Rocha e colaboradores (2013), a β -epoxi-carvona (composto obtido por meio de síntese orgânica da carvona) em testes realizados utilizando modelos animais, inibiu a reação inflamatória aguda apresentando um efeito antinociceptivo central e periférico, o que provavelmente está associada com a ativação do sistema opióide. Outro estudo realizado por Marques e colaboradores (2014) utilizando um derivado sintético da carvona (Cyane-carvona) também demonstrou resultados promissores para o tratamento de doenças da dor e inflamação.

Em estudo realizado por Muruganathan & Srinivasan (2016) avaliaram a ação hipoglicêmica da carvona em ratos normais e com diabetes induzido por estreptozotocina. Os resultados obtidos foram comparados com a gliclazida (fármaco de hipoglicemia oral padrão), a administração oral diária de carvona (50 mg/kg) a ratos diabéticos durante 30 dias resultou numa diminuição significativa nos níveis de glicose plasmática, a análise histopatológica do fígado e do pâncreas e a imuno-histoquímica do pâncreas também revelaram que o tratamento com carvona reduziu o dano induzido por estreptozotocina às células hepáticas e β do pâncreas.

Porém, os monoterpenos como a carvona possuem algumas limitações como: baixa solubilidade em água, alta volatilidade e baixa estabilidade química que podem consequentemente minimizar seus efeitos farmacológicos. Atualmente, sistemas de liberação de fármacos como as ciclodextrinas vêm sendo desenvolvidos a fim de melhorar as propriedades físico-químicas e aumentar a biodisponibilidade desses compostos (SERAFINI et al., 2011; MENEZES et al., 2012; MENEZES et al., 2014; XU et al., 2014).

2.4. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs), também conhecidas como cicloamiloses, cicloglucanos ou dextrinas de Schardinger foram descobertas em 1891 por Villiers, a partir do processo de degradação enzimática do amido com o *Bacillus amylobacter*, o qual recebeu o nome de "cellulosine", já que possuía características semelhantes à celulose. Posteriormente, entre os anos de 1903 a 1911 Franz Schardinger realizou uma abordagem mais detalhada com relação à preparação, isolamento e caracterização, sendo capaz de isolar dois produtos cristalinos nomeados de 'dextri cristalino α ' e 'dextri cristalino β '.

Através dos estudos realizados por Freudenberg, entre o período de 1935 a 1955, ampliaram todo o conhecimento com relação à estrutura química das ciclodextrinas, produção e suas propriedades físico-químicas onde foi possível elucidar o mecanismo de formação das CDs através da ação da enzima ciclodextrina-glicosil-transferase sobre o amido (DEL et al., 2004; LIMA et al., 2008; ELLOUZE et. al., 2011; MORIWAKI et al., 2014).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos compostos de unidades de glicose. As CDs naturais mais comumente utilizadas são (α -, β -, e γ -CD) e são formadas por 6,

7 e 8 unidades de D-(+)-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas α -(1-4) (CEBORSKA et al., 2015; GARCÍA et al., 2016) (Tabela 2).

Tabela 2: Dimensões das ciclodextrinas naturais.

Tipo de ciclodextrina	Números de unidades de glicose	Diâmetro da cavidade (Å)	Altura da cavidade (Å)	Volume da cavidade (Å ³)
α	6	4,7-5,3	7,9	174
β	7	6,0-6,5	7,9	262
γ	8	7,0-8,3	7,9	427

Fonte: Jambhekar et al., 2015

As CDs são moléculas cristalinas, homogêneas, não higroscópicas e apresentam estrutura relativamente rígida, em formato de “cones truncados” (Figura 3), na qual sua superfície dispõe de um caráter hidrofílico, devido à presença de hidroxilas livres, o que as torna facilmente solúveis em meio aquoso (MAVRIDIS et al., 2015). Por outro lado, sua cavidade hidrofóbica é capaz de interagir com uma grande variedade de moléculas de diversos tamanhos, permitindo acomodar em seu interior total ou parcialmente essas moléculas formando um sistema hópede-hospedeiro através de interações intermoleculares, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas (CIOBANU et al., 2013; CEBORSKA et al., 2015; ROMÁN et al., 2016).

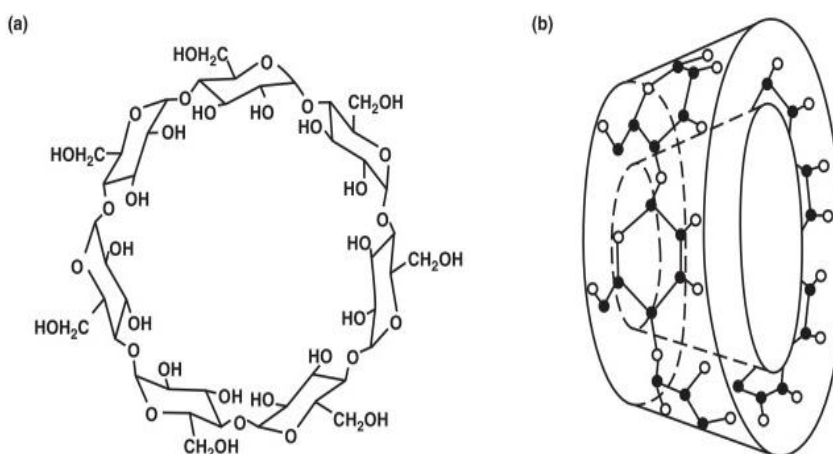


Figura 3: Estrutura química (a) e a forma toroidal (b) da molécula de β -ciclodextrina. Fonte: (LOFTSSON et al., 1998).

As CDs são amplamente utilizadas para melhorar a estabilidade e biodisponibilidade de fármacos fracamente solúveis (MENEZES et al., 2012; MENEZES et al., 2014; CHMURSKI et al., 2016) e apresentam baixa imunogenicidade (DAVIS & BREWSTER, 2004) além disso, são atóxicas (STELLA & HE, 2008). Devido as suas diversas propriedades já relatadas na literatura, as CDs são comumente empregadas como adjunto tecnológico nas indústrias farmacêuticas (JAMBHEKAR et al., 2015; MAVRIDIS et al., 2015), de cosméticos (EL RIES et al., 2013) e de alimentos (KFOURY et al., 2015). Entre as CDs naturais, a β -ciclodextrina (β -CD) é a mais utilizada na indústria farmacêutica (Tabela 03, página 27) devido as suas propriedades físico-químicas, diâmetro da cavidade e volume adequado e melhor custo-benefício (LIU et al., 2016).

De acordo com Vecsernyés e colaboradores (2014) em 2008, foram encontradas 600 patentes e pedidos de patentes publicados em formulações de fármacos contendo CDs. Atualmente existem numerosos exemplos para a aplicação de CDs como adjuvante tecnológico estratégico aplicada em produtos farmacêuticos. Pesquisa realizada por Cho e colaboradores (2015) centrada na preparação de uma formulação para melhorar a biodisponibilidade do pó nasal de calcitonina de salmão utilizando alguns excipientes como intensificadores de absorção nasal incluindo a β -CD. Sawatdee e colaboradores (2014) realizou estudo com o citrato de sildenafil complexado com HP- β , γ e α ciclodextrina com o objetivo de aumentar sua solubilidade em água antes do desenvolvimento de uma formulação inalatória para o tratamento de hipertensão pulmonar.

As CDs, devido à sua capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de moléculas pouco solúveis, alcançaram uma grande importância nos processos de tecnologia farmacêutica no que se refere por exemplo a modificação nas características físico-químicas e melhora na estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade dos fármacos (KORYTKOWSKA-WAŁACH et al., 2017).

Tabela 3: Medicamentos disponíveis no mercado mundial contendo β -CD (CUNHA-FILHO et al 2007)

Fármaco	Nome comercial	Indicação	Formulação	Fabricante/País
Benexate	Ulgut, Ionmiel	Antiulcerogênico	Cápsulas	Teikoku/Japão
Dexametasona	Glymesason	Analgésico	Creme dérmico	Fujinaga/Japão
Iodine	Mena-Gargle	Antiséptico	Líquido tópico	Kyushin/ Japão
Nicotina	Nicorette Nicogum	Redução dos sintomas de abstinência	Comprimido sublingual/ Goma de mascar	Pharmacia Upjohn/Suécia
Nimesulida	Mesulid/Nimedex	Antiinflamatório	Sachê oral	Novartis/Itália
Nitroglicerina	Nitropen	Dilatador coronário	Comprimido sublingual	Nippon Kayaku/Japão
Omeprazol	Omebeta	Antiulcerogênico	Comprimido	Betapharm/Alemanha
PGE2	Prostarmon E	Indução de parto	Comprimido sublingual	Ono/Japão
Piroxicam	Cicladol Brexin,	Antiinflamatório	Comprimido /Sache/ Supositório	Masterpharma/Itália, Chiesi/Italia
Ácido tiaprofênico	Surgamyl	Analgésico	Comprimido	Roussel-Maestrelli/Itália
Óleo de alho	Xund/Tegra/Allide/ Garlessence	Arteriosclerose	Drágea	Bipharm/Alemanha
Cefalosporina	Meiact	Antibiótico	Comprimido	Meiji Seika/Japão
Difenildramina	Stada-Travel	Antiemético	Comprimido mastigável	Stada/Alemanha
Clordiazepóxido	Transsillium	Ansiolítico	Comprimido	Gador/Argentina
Cisaprida	Coordinax Prepulsid	Estimulante TGI	Supositório	Jassen/Bélgica
Cetirizina	Cetirizin	Antialérgico	Comprimido mastigável	Losan Pharma/Alemanha
Dextrometorfano	Rynathisol	Antitussivo	Solução oral	Synthelabo/França

2.5. Complexos de inclusão (CIs)

A capacidade para formar CIs com uma grande variedade de moléculas é uma das propriedades mais interessantes das CDs e tem sido a base para a maioria das suas aplicações na área farmacêutica (MURA, 2014). A complexação de fármacos afeta positivamente muitas das propriedades físico-químicas, otimizando e proporcionando numerosos benefícios (SAOKHAM & LOFTSSON, 2016). Em destaque, esse potente excipiente é utilizado para mascarar odores e sabores desagradáveis, aumentar a biodisponibilidade via oral, diminuir a irritabilidade gastrointestinal e oculares, além de reduzir efeitos adversos e prevenir interações fármaco-excipiente (GAMSIZ et al., 2013; GARCIA et al., 2014).

A afinidade da molécula hóspede pela CD se dá através da constante de estabilidade do complexo e ocorre frequentemente com uma relação estequiométrica de 1:1 ou 1:2 hóspede-hospedeiro (KORYTKOWSKA-WAŁACH et al., 2017). Na Figura 4 podemos observar a representação esquemática da formação do CI na razão molar 1: 1 em meio aquoso. O CI é formado através da interação hidrofóbica entre a molécula hóspede na cavidade da CD. Vários tipos de forças estão envolvidas na formação do complexo, incluindo interações eletrostáticas, redução da tensão conformacional, ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo, força de van der Waals e dispersão (MELANI et al., 2015).

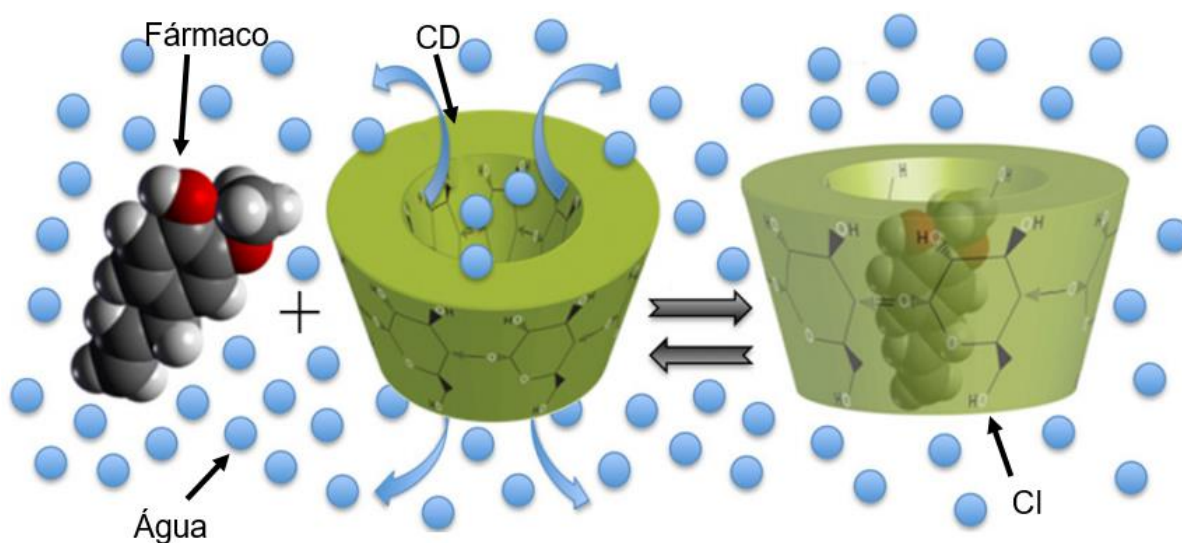


Figura 4. Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão com ciclodextrina (MURA, 2014).

Inúmeros estudos investigaram a formação de complexo de inclusão com óleos essenciais e β -CD. Em trabalhos recém publicados foram observados alterações nas características intrínsecas dos OEs, assim como, melhoria na atividade farmacológica (GUIMARÃES et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016).

Oliveira e colaboradores (2016) avaliaram o efeito anti-hiperalgésico do OE α -terpineol complexado em β -CD em modelo animal de dor muscular não inflamatória crônica, em seus resultados foi possível observar que o α -terpineol/ β -CD tem um perfil analgésico melhor do que o OE livre, comprovando que a complexação em β -CD é capaz de melhorar a atividade farmacológica do α -terpineol e concluiu que o CI α -terpineol/ β -CD pode representar uma ferramenta promissora para o estudo e desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica no manejo da "dor disfuncional", como a fibromialgia. Em um outro estudo de CI com OEs desenvolvido por Silva e colaboradores (2016), mostrou que os CIs carvacrol/ β -CD apresentaram um maior efeito antinociceptivo em comparação com carvacrol livre para o tratamento da dor orofacial comprovando que CDs são alternativas importantes para melhorar a biodisponibilidade de compostos naturais como os terpenos.

2.6. Métodos de caracterização

Os métodos de caracterização de CIs com CDs são capazes de avaliar a formação de complexos a partir de modificações nas propriedades físico-químicas que podem ser observadas quando ocorre a inclusão da molécula hóspede no interior da cavidade da ciclodextrina (SINGH et al., 2010). De acordo com estudo realizado por Lima e colaboradores (2016) as técnicas de caracterização CI mais utilizadas são : calorimetria exploratória diferencial (40%), ressonância magnética nuclear (37%), difração de raios-X (34%), espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (33%), e termogravimetria/termogravimetria derivada (23%)

No geral, todas as técnicas são importantes, uma vez que uma única técnica não pode fornecer dados completos sobre a formação do complexo. Muitas vezes requer o uso de diferentes métodos analíticos, cujos resultados deve ser combinados e analisados em conjunto, já que cada método explora uma característica específica (MURA, 2014).

2.6.1 Análise térmica

A calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG) são técnicas analíticas importantes bastante utilizadas no estudo de caracterização físico-química de reconhecimento de complexos de inclusão (FIGUEIRAS et al., 2007; ARAÚJO et al., 2009; WANG et al., 2011). Elas permitem avaliar o estado físico do composto livre ou complexado e fornecem informações indispensáveis acerca das interações hóspede-hospedeiro (DANDAWATE et al., 2014).

Através da técnica DSC é possível realizar detecção quantitativa de todos os processos que requerem energia (ARAÚJO et al., 2009). Quando uma molécula está incluída nas cavidades da β -CD, o ponto de fusão, ebulição e sublimação são deslocados para diferentes temperaturas ou simplesmente desaparecem (ABARCA et al., 2016).

Já a técnica de (TG/DTG) é bastante utilizada em contribuição com o DSC, pois fornece dados de perda de massa de um determinado composto em função do aumento da temperatura (MURA, 2014). Dessa forma, a estabilidade térmica da análise de um composto pode diferir nas características de formação do CI através da etapa de degradação em relação às amostras isoladas (DING et al., 2013).

2.6.2 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A FTIR é considerada uma das mais importantes técnicas envolvidas para a caracterização de CI em termos de identificação e/ou determinação de características estruturais dos complexos, principalmente no que se refere à posição das bandas de absorção espectral dos grupos funcionais e de ligações presentes (LIMA et al., 2016). No CI, as interações dão origem a uma modificação significativa do espectro de absorção da molécula hóspede através de alterações como ampliação e variação na intensidades das bandas e deslocamento em suas posições que permite realizar uma análise quantitativa (PERIASAMY et al., 2014; MURA, 2014).

2.6.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta importante para a elucidação estrutural de uma molécula ou composto. Em comparação com outras técnicas para a caracterização de CI, é a mais amplamente utilizada para a compreensão, pois fornece informações que permite visualizar de forma direta as interações que ocorrem quando a molécula hóspede é introduzida na cavidade da CD, sendo capaz de diferenciar qual parte da estrutura química do fármaco foi complexada (KORYTKOWSKA-WAŁACH et al., 2017). Atualmente, muitos trabalhos utilizam a técnica de RMN afim de investigar a interação entre CD e o fármaco (DUFOUR et al., 2015; MAYER et al., 2016; KULKARNI et al., 2017; ABDOLMALEKI et al., 2017).

2.6.4 Difração de raios X (DRX)

É uma técnica amplamente utilizada para avaliar as alterações cristalinas nos CI com CD (GUO et al., 2011). O emprego desta técnica baseia-se na comparação dos difratogramas das substâncias livres e do CI através das alterações na cristalinidade das amostras por meio do surgimento ou desaparecimento de algumas linhas espectrais o que pode ser indicativo de formação dos CIs (MENEZES et al., 2016).

2.6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica empregada capaz de fornecer imagens de alta resolução da superfície de uma amostra (NARCHIA et al., 2017). Atualmente, a MEV é muito utilizada em estudos com CI, pois esta técnica permite avaliar as alterações morfológicas na estrutura superficial das moléculas que consequentemente possibilita diferenciar uma substância pura e as interações hóspede-hospedeiro na formação do CI através de suas imagens (LYRA et al., 2010; PERIASAMY et al., 2014; MICHALSKA et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Desenvolver, caracterizar e comparar os diferentes métodos de complexação entre a R-(-)-carvona e a β -ciclodextrina.

3.2 Específicos

- Preparar as amostras pelos métodos da mistura física (MF), malaxagem (MA), coevaporação (CE), ultrassom (US) e liofilização (LF);
- Avaliar o perfil térmico das amostras por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG);
- Caracterizar fisicamente os componentes e seus complexos de inclusão por difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Caracterizar quimicamente as amostras através da técnica de espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Desenvolver o método analítico para quantificação da R-(-)-carvona por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinar a eficiência de complexação (EC%) dos métodos obtidos por CLAE.

4 METODOLOGIA

4.1 Material

4.1.1 Reagentes e solventes

- R-(-)-carvona (Sigma®);
- Acetato de etila (Vetec®);
- β -ciclodextrina (97%; peso molecular 1135 g.mol⁻¹, Sigma®);
- Sílica gel (Fluka®);
- Metanol grau CLAE (Panreac®);
- Acetonitrila grau CLAE (Panreac®);
- Ácido acético glacial (Isofar®);
- Água ultra pura Milli-Q (Megapurity®);
- Membrana 0,45 μ m (Millipore®).

4.1.2 Equipamentos

- Balança analítica APX-200 (Denver®);
- Agitador magnético (Fisatom®);
- Capela de fluxo laminar;
- Cromatógrafo líquido Shimadzu®, equipado com um desgaseificador DGU-20A3, um injetor automático SIL-20A, duas bombas LC-20AD, detector de arranjo de diodo SPD-M20Avp (DAD) acoplados a uma interface CBM-20^a;
- Coluna cromatográfica C18 de fase reversa de 150 x 4,6 mm; tamanho de partícula 5 μ m (Phenomenex®);
- Banho ultrassom USC 1450 (Unique®);
- Célula DSC-60 (TA Instruments®);
- Termobalança TGA-60 (TA Instruments®);
- Titulador volumétrico de KF modelo 870 KF Titrino Plus (Methrom®);
- Difratorômetro de raios X modelo D5000 (Siemens®);
- Espectrofotômetro de infravermelho modelo IRTracer-100 (Shimadzu®);
- Liofilizador (FreeZone 4.5®);
- Microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-6390-LV (JEOL®).

4.2 Métodos

4.2.1 Busca de anterioridade

A busca de anterioridade foi realizada de acordo com os pedidos de patente depositados no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), no European Patente Office (Espacenet), na World Intellectual Property Organization (WIPO) e no United States Patent and Trademark Office (USPTO). O tema central da pesquisa foi a carvona complexada com beta-ciclodextrina. As palavras-chave utilizadas foram carvone (carvona), monoterpene (monoterpenos), essential oil (oleos essenciais) e inclusion complexes (complexos de inclusão). Foram utilizados os campos de pesquisa “título” e “resumo” com a classificação internacional de patentes A16K, referente a preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas.

4.2.2 Obtenção dos complexos de inclusão R-(-)-carvona/ β -CD

4.2.2.1 Mistura física (MF)

A MF foi obtida com o objetivo de realizar as devidas comparações entre os componentes e os complexos de inclusão formados. Para a MF foram pesadas 150 mg da R-(-)-carvona (150 g.mol^{-1}) e 1135 mg de β -CD (1135 g.mol^{-1}) na razão molar de 1:1. Esse método consiste na simples mistura mecânica em um gral com auxílio de pistilo sem adição de solvente.

4.2.2.2 Malaxagem (MA)

A MA foi preparada conforme o item 4.2.1.1, seguido de adição de água em quantidade suficiente para formação de uma pasta.

4.2.2.3 Coevaporação (CE)

O CE foi preparado por meio da adição de 20 mL de água destilada a um almofariz contendo 150 mg de R-(-)-carvona e 1135 mg de β -CD, em razão molar de 1:1. A mistura foi submetida à uma agitação magnética constante de 400 rpm, durante 36 horas e transferida para o dessecador para remoção de toda umidade.

4.2.2.4 Ultrassom (US)

O método de inclusão por US foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Su e colaboradores (2012). A β -CD foi dissolvida separadamente em 100 mL de água destilada, enquanto a R-(-)-carvona foi dissolvida em 100 mL de etanol e adicionada lentamente na solução de β -CD sob agitação constante. A mistura resultante foi submetida ao banho de ultrassom durante 60 minutos. A solução final foi mantida durante a 12h sob refrigeração a -4°C . O precipitado obtido (R-(-)-carvona/ β -CD) foi filtrado e lavado, uma vez com água destilada e duas vezes com acetato de etila 30%, para remover a R-(-)-carvona adsorvida na superfície da β -CD (não complexada), em seguida a amostra foi congelada e submetida à liofilização a -50°C por 24h.

4.2.2.5 Liofilização (LF)

O LF foi preparado por meio da adição de 20 mL de água destilada a um almofariz contendo 150 mg da R-(-)-carvona e 1135 mg de β -CD, em razão molar de 1:1. A mistura foi submetida à uma agitação magnética constante durante 36 horas a 150 rpm, em seguida, a solução foi mantida sob refrigeração de -4°C . A solução congelada, foi liofilizada a -50°C e 1,09 Pa para remoção de toda umidade.

Todas as amostras anteriormente citadas foram acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados para melhor conservação e armazenadas em dessecador em temperatura ambiente.

4.3 Caracterização físico-química e morfológica

4.3.1 Análise térmica

As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura de 25 a 500°C , sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. As amostras foram colocadas em cápsula de alumínio contendo aproximadamente 2 mg. As curvas TG/DTG foram analisadas na faixa de temperatura de 25 a 900°C , sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ($100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ utilizando porta-amostra de platina contendo

aproximadamente 3 mg de amostra. O equipamento foi previamente verificado no eixo de temperatura utilizando padrão de oxalato de cálcio com pureza de 99,99%. As análises foram realizadas no Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidade (LeFT), Departamento de Farmácia-UFS e no Laboratório de Tecnologias Alternativas (LTA-UFS), em colaboração com o Prof. Dr. Gabriel Francisco da Silva.

4.3.2 Determinação de umidade por Karl Fischer (KF)

Para determinação do teor de umidade das amostras foi utilizado um titulador volumétrico de KF. O solvente de titulação empregado foi o metanol. O procedimento foi realizado em triplicata. As análises foram realizadas no LeFT-UFS.

4.3.3 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho da R-(-)-carvona, β -CD, MF, MA, CE, US e LF foram obtidos na faixa espectral de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, em pastilhas de KBr, utilizando um equipamento espectrofotométrico em temperatura ambiente no LeFT-UFS.

4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras da R-(-)-carvona, β -CD, MF, MA, CE, US e LF foram montadas em *stubs* de alumínio, submetidas à metalização com feixes de ouro e visualizadas em um microscópio eletrônico com aceleração de voltagem de 8 kV. As análises foram realizadas no Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz em colaboração com o Prof Dr. Daniel Pereira Bezerra.

4.3.5 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas das amostras foram obtidas operando em modo de varredura, com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e filtro de níquel com voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA, sob intervalo de 3 a 40° (2θ) e 1s a cada passo. As análises foram realizadas no Instituto de Geociências, do Departamento de Mineralogia e

Geotectônica, da Universidade de São Paulo em colaboração com o Prof. Dr. Flávio Machado de Souza Carvalho.

4.4 Desenvolvimento do método analítico para quantificação da R-(-)-carvona por CLAE

4.4.1 Condições cromatográficas

Para as análises cromatográficas, foi preparada uma solução padrão de 100 µg/mL de R-(-)-carvona diluída em acetonitrila, a qual foi submetida a banho de ultrassom durante 10 minutos e posteriormente filtrada em filtros de membrana PTFE de 0,45 µm antes da injeção no CLAE. Para o desenvolvimento do método analítico, utilizou-se uma coluna C18 de fase reversa de 150 x 4,6 mm (5 µm tamanho de partícula). A taxa de fluxo foi de 0,8 mL/min e um volume de injeção da amostra de 20 µL. Como fase móvel, foi empregado um sistema constituído de acetonitrila/água na proporção de 55:45, durante 15 minutos de análise. Para a aquisição dos cromatogramas, o comprimento de onda usado para a detecção da R-(-)-carvona foi de 254 nm (detector de arranjo de diodos).

4.4.2 Desenvolvimento do método

O método analítico foi desenvolvido de acordo com a linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez seguindo os parâmetros estabelecidos pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos) cujo órgão emissor é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). A linearidade foi estabelecida avaliando o R^2 (coeficiente de correlação) de uma curva de calibração obtida com a substância padrão da R-(-)-carvona em cinco concentrações diferentes (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL). O LD e LQ foram determinados pela relação sinal/ruído, sendo que foi utilizado uma relação sinal/ruído de 3 para o LD e uma relação sinal/ruído de 10 para o LQ. A precisão foi avaliada de acordo com a repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia).

Para os ensaios de repetibilidade (1), foram preparadas amostras da R-(-)-carvona em 3 concentrações diferentes: baixa (5 µg/mL), média (25 µg/mL) e alta (100 µg/mL), as quais foram analisadas em triplicata. Outro teste para avaliar a

repetibilidade (2) do método, foi a partir de análises da R-(-)-carvona a 100% da concentração do teste, sendo realizada nove determinações. Para os ensaios de precisão intermediária, as amostras de R-(-)-carvona (100 µg/mL) foram analisadas seis vezes, em dias diferentes (dia 1 e 2) com analistas diferentes. Os resultados de precisão foram expressos através do desvio padrão relativo (DPR) das análises.

A exatidão foi avaliada analisando três diferentes amostras de R-(-)-carvona em três diferentes concentrações: 5 µg/mL (baixa), 25 µg/mL (média) e 100 µg/mL (alta). Os resultados foram expressos de acordo com a exatidão média percentual e o desvio padrão relativo (DPR) das análises. A robustez do método foi avaliada através de análises da R-(-)-carvona, realizando alterações no fluxo da fase móvel (0,8; 0,9; 1,0 e 1,1 mL/min) e utilizando diferentes colunas analíticas (C18 150 x 4,6 mm e C18 250 x 4,6 mm).

4.5 Eficiência de complexação (EC)

Para calcular a EC%, 5 mg de cada complexo (MF, MA, CE, US e LF) foram dissolvidos em 5 mL de acetonitrila e as soluções obtidas foram mantidas em agitação constante durante 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as soluções foram centrifugadas à 3200 rpm por 15 minutos para remover a β-CD da solução, deixando apenas o composto ativo (R-(-)-carvona). Após a centrifugação, 2 mL do sobrenadante foram coletados e analisados por CLAE. A EC% foi calculada de acordo com a seguinte equação (1):

$$EC\% = \frac{QEC}{QTC} * 100$$

Onde: “QEC” é a quantidade experimental de R-(-)-carvona, isto é, quantidade de R-(-)-carvona extraída do complexo de inclusão e “QTC” é a quantidade teórica de R-(-)-carvona, que corresponde à quantidade de R-(-)-carvona inicialmente utilizada para preparar o CI.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Busca de anterioridade

A busca de patentes junto às bases de dados comprovou o caráter inovador do estudo. No escritório americano de registro de Marcas e Patentes (USPTO – PATENTS) e no Escritório Europeu de Patentes (EPO- Espacenet) foram encontrados oito e seis registros de patente, respectivamente, acerca do óleo essencial da carvona, mas nenhum utilizando complexos de inclusão, nem o óleo para a mesma finalidade deste trabalho. A busca no Órgão Central do Sistema Internacional de Propriedade Intelectual (WIPO), identificou um registro de patente com o número BRPI1106242, que trata da utilização de formulações farmacêuticas contendo carvona para o tratamento de doenças neurodegenerativas, porém sem a utilização de complexos de inclusão. E a busca na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), não identificou resultados com a combinação de palavras-chave utilizadas.

5.2 Caracterização físico-química e morfológica

A β -CD apresenta diversos benefícios para a formação de complexos de inclusão com os monoterpenos, contornando as limitações características de moléculas apolares.

Neste estudo, foram discutidos os resultados de caracterização físico-química e morfológica dos componentes e CIs da R-(-)-carvona com a β -CD na razão molar 1:1, utilizando os métodos de: MF, MA, CE, US e LF.

5.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Na Figura 5 estão representadas as curvas DSC da R-(-)-carvona, β -CD e dos métodos de complexação. A curva DSC da β -CD exibiu um evento endotérmico na faixa de temperatura de 43-120 °C ($T_{pico} = 101,6$ °C), correspondente à desidratação da molécula (PINTO et al., 2005). É possível observar na faixa de temperatura de 220-230 °C um evento característico de transição de fase cristalina da β -CD, um fenômeno físico já descrito por Serafini e colaboradores (2012) e Menezes e colaboradores (2014), e na faixa de temperatura de 306-320 °C ($T_{pico} =$

316,68 °C) um evento correspondente a fusão da molécula, seguido de sua decomposição térmica e eliminação do material carbonáceo, a partir de 334 °C.

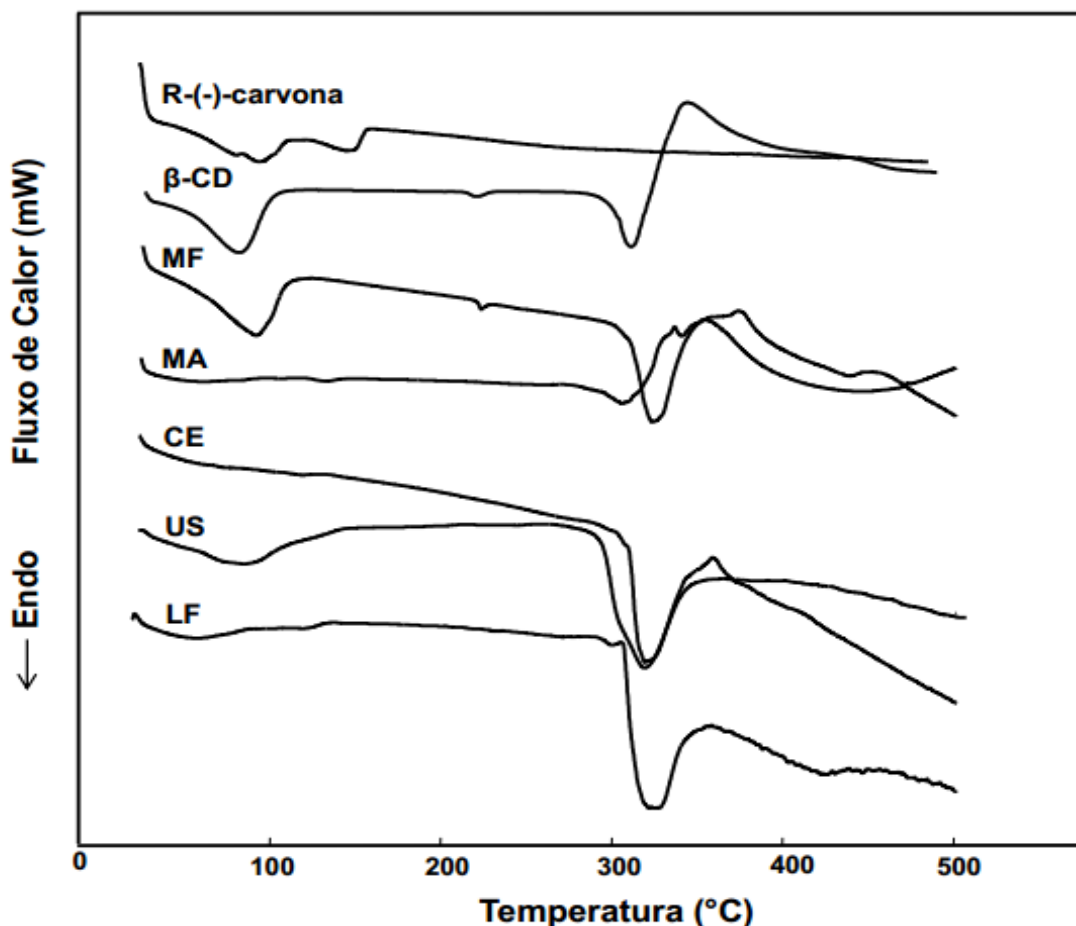


Figura 5. Curvas DSC da R-(-)-carvona, β -CD, MF, MA, CE, US e LF, analisadas em atmosfera de N_2 (50 mL min^{-1}), com razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ na faixa de temperatura entre 25 e $500 \text{ }^\circ\text{C}$

A curva DSC da R-(-)-carvona exibiu evento endotérmico na faixa de temperatura de 34-150 °C ($T_{\text{pico}} = 145,2 \text{ }^\circ\text{C}$) correspondente a sua volatilização seguida de decomposição. Observou-se na curva DSC da MF o somatório dos eventos endotérmicos da β -CD e da R-(-)-carvona sugerindo pouca interação da molécula hóspede com a molécula hospedeira, sendo este método menos eficiente para complexação. Essa observação já foi relatada por Menezes e colaboradores (2016) e Santos e colaboradores (2016) em trabalhos de caracterização com CDs e OEs.

As curvas DSC dos CIs apresentaram mudanças no perfil dos eventos térmicos quando comparados aos componentes livres, indicando melhor interação entre esses. Para todos os métodos não foi observado o evento endotérmico característico de volatilização da R-(-)-carvona na temperatura correspondente (145,2 °C), o que pode ser atribuído a complexação molecular da R-(-)-carvona no interior da cavidade da β -CD. Alguns autores relacionam o desaparecimento do pico de fusão, volatilização ou sublimação com a formação de complexos de inclusão (MURA, 2014; SANTOS et al., 2015).

As curvas DSC dos complexos também apresentaram deslocamento e redução na intensidade do evento de fusão da β -CD e, além disso, o desaparecimento ou redução do evento de fase cristalina da β -CD exibe uma mudança no arranjo molecular, indicando uma forte interação da R-(-)-carvona com a β -CD, sugerindo a complexação entre os diferentes métodos. Resultados semelhantes foram encontrados por Kamimura et al., (2014), Menezes et al., (2016), Serafini et al., (2012) e Hadaruga (2012) em seus trabalhos de CIs com β -CD e OEs que também observaram o desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos nos complexos e concluíram como um indicativo de formação de CIs.

5.4 Termogravimetria e termogravimetria derivada (TG/DTG)

A estabilidade térmica da R-(-)-carvona, β -CD, MF e dos CIs foram analisados por TG/DTG, representada na Figura 6 e Tabela 4 (página 42) Para as amostras analisadas, as perdas de massa foram calculadas a partir dos intervalos específicos de temperatura para cada método estudado, assim como percentuais de água determinado pelo método de KF.

Nas curvas TG/DTG da R-(-)-carvona foi possível observar uma etapa de perda de massa entre (34 – 150 °C) referente a sua volatilização ($\Delta m = 99,92\%$) não possuindo perda significativa nas etapas subsequentes. De acordo com Menezes e colaboradores (2015) este comportamento é característico de substâncias de baixo peso molecular tais como os monoterpenos.

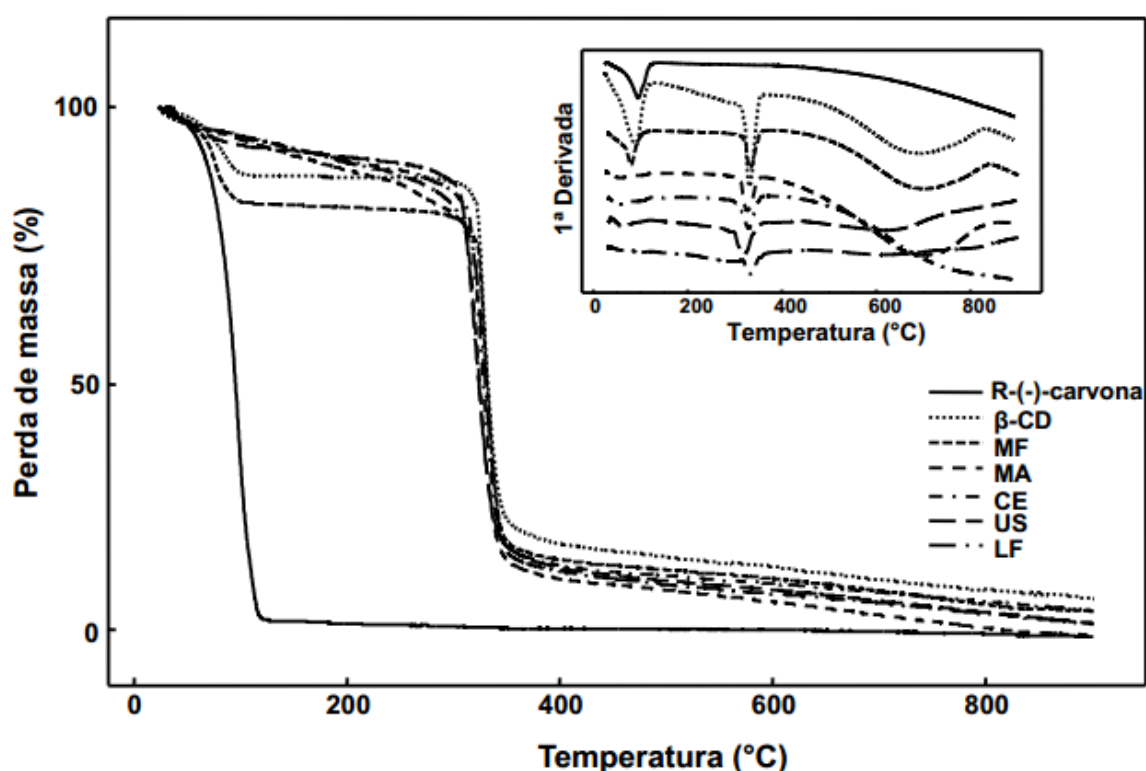


Figura 6. Curvas TG/DTG da R-(-)-carvona, β -CD, MF, MA, CE, US e LF, analisadas em atmosfera de N_2 (100 mL min^{-1}), com razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ na faixa de temperatura entre 25 e $900 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabela 4: Percentuais de perdas de massa (TG/DTG) e determinação da quantidade de água (KF) da R-(-)-carvona, β -CD, MF, MA, CE, US e LF.

Amostras	1ª Etapa % 34-150°C	2ª Etapa % 150-300°C	3ª Etapa % 300-400°C	4ª Etapa % 400-900°C	H ₂ O%
R-(-)-carvona	99,92 \pm 0,22	-	-	-	0,11 \pm 0,28
β -CD	13,72 \pm 0,27	1,18 \pm 0,25	75,79 \pm 0,31	9,31 \pm 0,28	13,75 \pm 0,39
MF	16,87 \pm 0,40	0,74 \pm 0,38	69,22 \pm 0,28	13,17 \pm 0,24	11,11 \pm 0,51
MA	8,02 \pm 0,39	10,95 \pm 0,22	69,15 \pm 0,17	11,88 \pm 0,33	8,16 \pm 0,32
CE	6,89 \pm 0,31	9,93 \pm 0,29	72,29 \pm 0,24	10,89 \pm 0,20	8,36 \pm 0,14
US	8,47 \pm 0,19	6,53 \pm 0,15	76,06 \pm 0,20	8,94 \pm 0,23	12,37 \pm 0,38
LF	5,18 \pm 0,18	12,08 \pm 0,21	72,2 \pm 0,25	10,54 \pm 0,22	4,43 \pm 0,18

As curvas TG/DTG da β -CD mostraram quatro etapas de perda de massa. A primeira na faixa de 34 – 150 °C ($\Delta m = 13,72\% \pm 0,27$), atribuída a perda de água presente na cavidade da molécula, conforme descrito por Hadaruga (2012) e corroborado com o resultado ($13,75\% \pm 0,39$) obtido pelo método de KF. Na segunda etapa (150 – 300 °C) foi verificado um patamar de estabilidade térmica com perda de massa de ($\Delta m = 1,18\% \pm 0,25$). A terceira etapa (300 – 400 °C) ocorreu uma perda de massa de ($\Delta m = 75,79\% \pm 0,31$), relacionada a decomposição térmica da β -CD. Em seguida, na quarta etapa (400 – 900 °C) pode-se observar uma perda de massa de ($\Delta m = 9,31\% \pm 0,28$) referente a eliminação do material carbonáceo.

As curvas TG/DTG da MF mostraram uma sobreposição dos eventos térmicos obtidos para a β -CD. A primeira perda de massa ($\Delta m = 16,87\% \pm 0,40$) ocorreu entre 34 - 150 °C referente à liberação de moléculas de H₂O a partir da cavidade da β -CD, que foi confirmada pela técnica de KF apresentando perda de ($11,11\% \pm 0,51$) de água.

Os complexos CE e LF apresentaram as menores perdas de massa na primeira etapa ($\Delta m = 6,89\% \pm 0,31$ e $\Delta m = 5,18\% \pm 0,18$) respectivamente, quando comparado aos outros complexos e MF, sugerindo que as moléculas de água presente na cavidade da β -CD foram substituídas pela R-(-)-carvona. A segunda etapa de perda de massa do CE e LF ($\Delta m = 9,93\% \pm 0,29$ e $\Delta m = 12,08\% \pm 0,21$) pode ser atribuída a inclusão da R-(-)-carvona na β -CD (GUIMARÃES et al., 2015; MENEZES et al., 2015). A terceira (300-400 °C) e quarta etapas (400-900°C) estão relacionadas a decomposição e eliminação do material carbonáceo da β -CD.

5.5 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A figura 7 mostra os espectros de FTIR da R-(-)-carvona, β -CD, MF e dos CIs. O espectro da β -CD exibiu uma banda larga com o máximo de absorção em 3340 cm⁻¹, devido as vibrações do alongamento dos diferentes grupos hidroxila (O-H) da β -CD e a banda em 1647 cm⁻¹, bem visível, está relacionada com as vibrações destes grupos. O espectro apresentou bandas em 2926 cm⁻¹ (vibrações C-H e de alongamento dos grupos CH e CH₂), em 1411-1246 cm⁻¹ devido as vibrações de alongamento CH e em 1154-1027 cm⁻¹ atribuídas as vibrações do alongamento C-O e das ligações entre os grupos de éter e hidroxila. Já a banda encontrada na região

de 1000-700 cm^{-1} corresponde as vibrações das ligações C-H e as vibrações do esqueleto C-C presentes no anel de glicopirranose. Resultados semelhantes foram obtidos por Sambasevam e colaboradores (2013) e Menezes e colaboradores (2014).

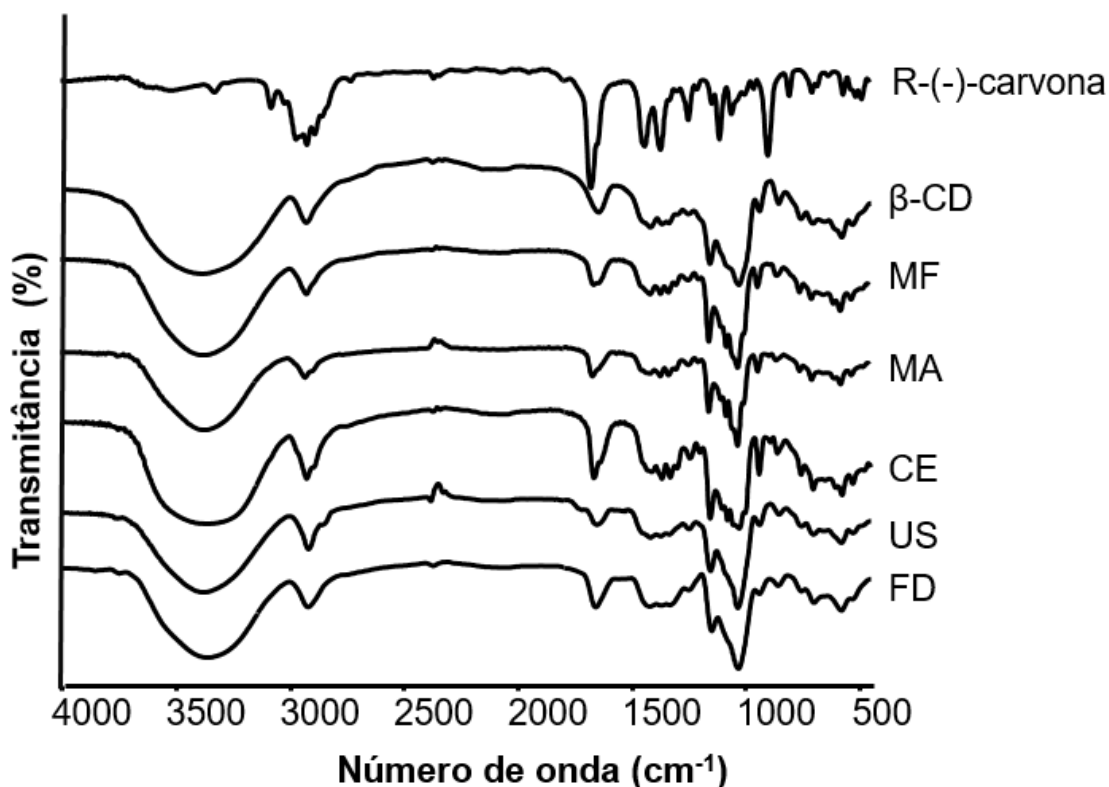


Figura 7. Espectros de infravermelho da R-(-)-carvona, β -CD, MF, MA, CE, US e LF obtidos em 4000 – 400 cm^{-1} .

O espectro da R-(-)-carvona apresentou uma banda em 3079 cm^{-1} que está relacionada ao alongamento CH de alcenos. A banda encontrada na região de 2986-2878 cm^{-1} está relacionada a presença de C-H alifático. A banda em 1675 cm^{-1} está relacionada a C=C de cicloalceno. É possível observar bandas em 1440 e 1368 cm^{-1} que correspondem à deformação angular CH_2/CH_3 ligados a carbonos primários ou secundários. As bandas observadas em 1247 e 1109 cm^{-1} estão relacionadas à presença da ligação C=O característico de cetona, e outra encontrada em 898 cm^{-1} corresponde a deformação angular C=C fora do cicloalceno.

Ao analisar as bandas que representam os complexos MA, CE, US e LF foi possível observar uma pequena mudança na intensidade e alongamento das bandas, devido à interação entre a R-(-)-carvona e a β -CD. As bandas observadas na região de 2971-2840 cm^{-1} e outra em 1660 cm^{-1} apresentaram mudanças na

intensidade quando comparado ao espectro da β -CD livre. Em 1369, 1333 e 942 cm^{-1} observou-se um aumento na intensidade dessas bandas nos métodos CE e LF quando comparadas com as bandas da MF e β -CD livre, sugerindo a interação entre a R-(-)-carvona e a β -CD.

5.6 Difração de raios X (DRX)

A técnica de DRX é útil para a detecção da complexação em ciclodextrinas em pó ou em estados microcristalinos (WANG et al., 2011). A Figura 8 representa os difratogramas de raios X da β -CD, MF e dos CIs. O difratograma da β -CD apresentou um perfil predominantemente cristalino, destacando-se picos de difração característicos de grande intensidade em $2\theta = 4,48; 8,87; 10,55; 12,46$ e $15,41^\circ$. Resultados semelhantes foram encontrados por Siqueira-lima e colaboradores (2014) e Menezes e colaboradores (2016).

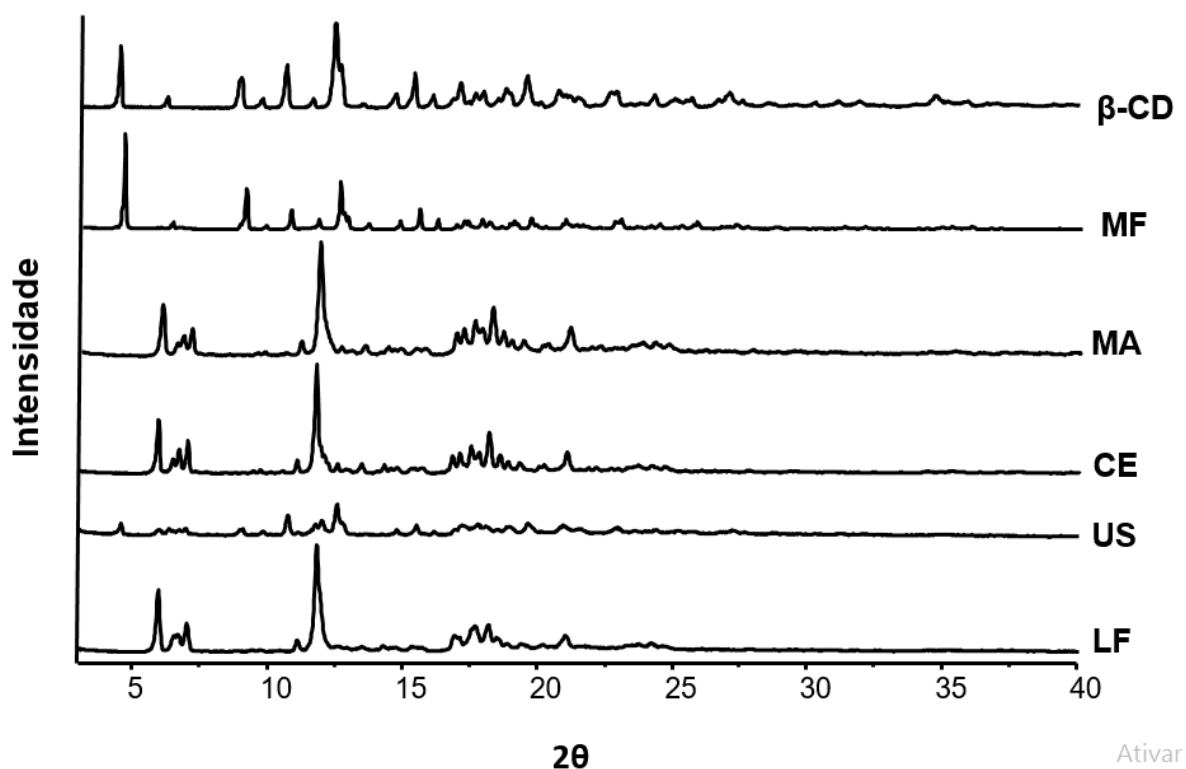


Figura 8. Difratogramas de raios X da β -CD, MF, MA, CE, US e LF obtidos em 2θ ($3 - 40^\circ$).

Os difratogramas dos complexos MA, CE e LF exibiram o desaparecimento das linhas espectrais $4,48^\circ$ e $15,41^\circ$ (2θ) características da β -CD e foi observado o surgimento de novos picos entre $5,92^\circ$ e $7,07^\circ$ (2θ). Já no difratograma do complexo

US foi possível observar um perfil amorfo, que pode ser atribuído ao método de obtenção.

A partir da análise dos difratogramas dos complexos MA, CE e LF um novo perfil de difração foi observado, com diminuição no grau de cristalinidade e tendência para amorfização, sugerindo a complexação. Essa observação está de acordo com Abarca e colaboradores (2016) que avaliaram CIs em β -CD contendo óleo essencial por DRX e relataram a presença de novos picos de difração e o desaparecimento de picos característicos da β -CD, indicando que isso pode estar associado a mudanças na organização molecular da β -CD e que são fortes evidências para formação de CIs.

5.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV é uma técnica bastante utilizada para definir qualitativamente a formação de CIs (TAKAHASHI, 2009). As fotomicrografias obtidas em aumento de 400 e 700x representadas na Figura 9 (página 47) elucidaram as diferenças morfológicas da β -CD, MF e dos CIs obtidos. Na morfologia da β -CD livre pode-se observar partículas cristalinas de tamanho irregular de forma retangular, com superfície e contorno bem definidos, como observado no trabalho de Gong e colaboradores (2016). Este perfil foi mantido no método de MF mostrando semelhança morfológica, indicando pouca interação entre a R-(-)-carvona e a β -CD como descrito no trabalho de Oliveira e colaboradores (2016), na qual esse método mostrou pouco eficiente corroborando com os resultados discutidos anteriormente.

Por sua vez, os complexos obtidos por MA, CE, US e LF apresentaram mudanças relevantes na morfologia, em relação ao tamanho das partículas, quando comparado a β -CD livre e a MF, resultando em aglomerados que sugerem uma modificação do cristal e do pó, sugerindo assim a formação de complexos. Entretanto, os métodos de US e LF apresentaram partículas menores em relação aos demais métodos de complexação. Essa observação está de acordo com resultados obtidos por Santos e colaboradores (2016), os quais observaram que os CIs dispõem de uma tendência para agregação, sugerindo a existência de materiais amorfos quando na formação de complexos.

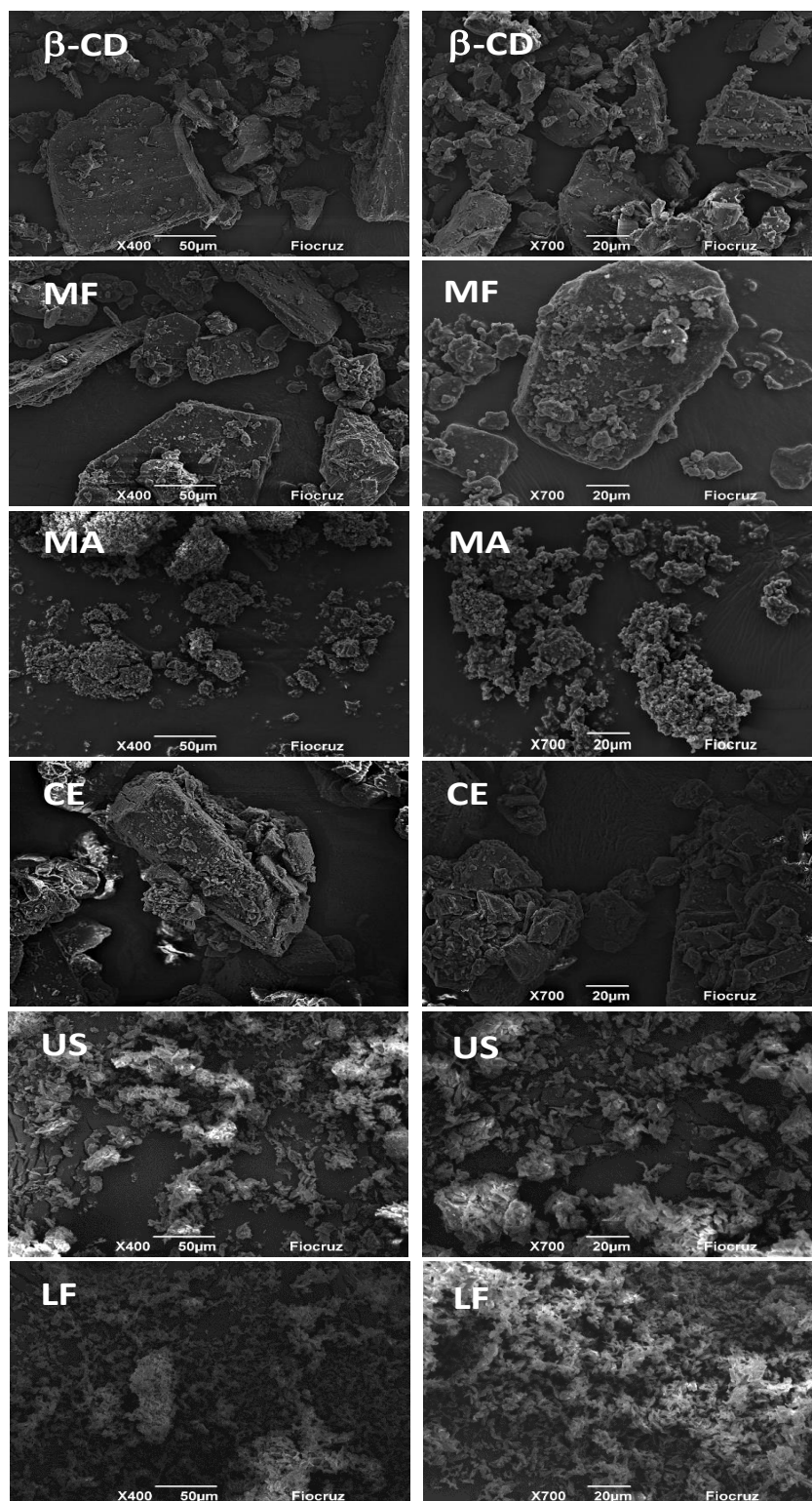


Figura 9. Fotomicrografias eletrônicas de varredura da β -CD, MF, MA, CE, US e LF obtidas nos aumentos de 400x e 700x.

As imagens de MEV dos CIs corroboraram com os resultados de DRX obtidos anteriormente, na qual a formação de um novo perfil de difração foi acompanhado pela diminuição no grau de cristalinidade com tendência para amorfização, indicando a complexação.

5.8 Desenvolvimento do método analítico para quantificação de R-(-)-carvona por CLAE

A figura 10 mostra o cromatograma da R-(-)-carvona obtido após a otimização do método, no comprimento de onda de 254 nm. O pico da R-(-)-carvona mostrou um tempo de retenção de 8,91 minutos. Com esses resultados podemos concluir, que a fase móvel constituída de uma mistura de acetonitrila/água foi eficaz para a identificação da R-(-)-carvona, pois mostrou um pico com uma boa resolução cromatográfica.

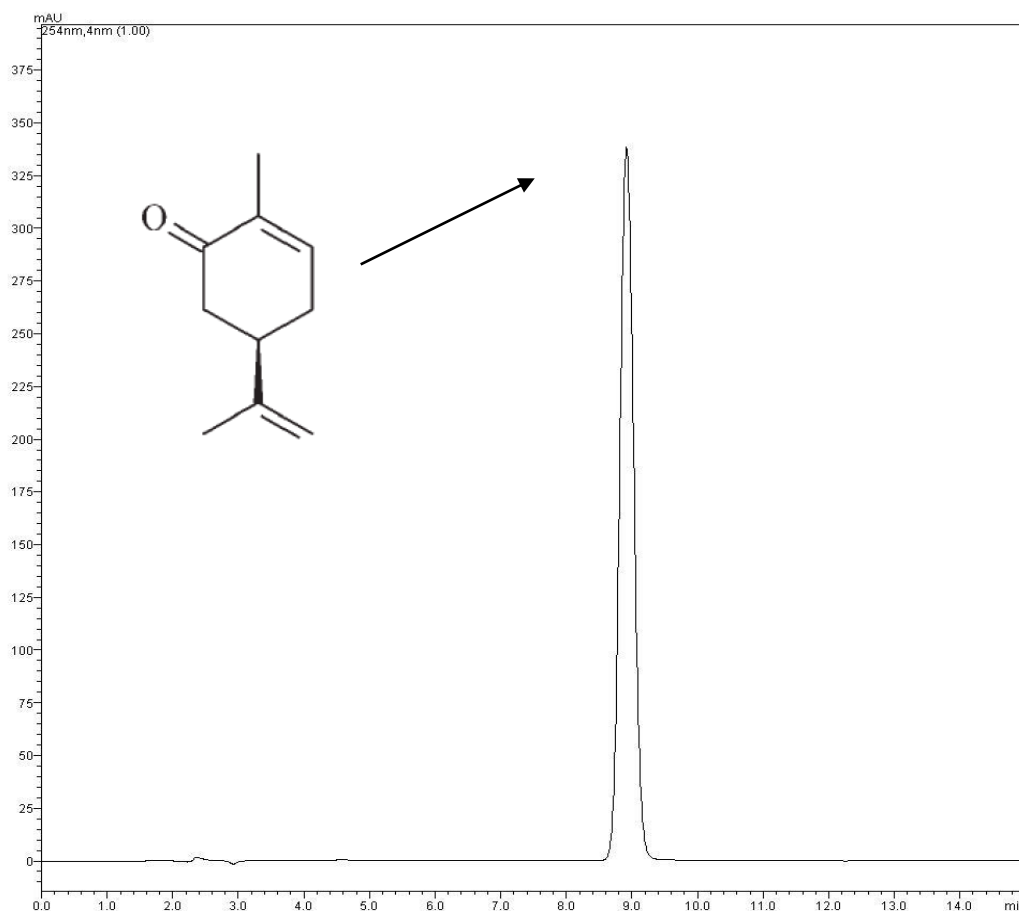


Figura 10: Cromatograma da R-(-)-carvona (100 µg/mL; HPLC; 254 nm).

O método foi desenvolvido de acordo com a linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez. A curva de calibração determinada no intervalo das concentrações de 5 - 100 µg/mL, obteve a equação da reta de $y = 63407x + 32534$ e o coeficiente de correlação R^2 de 0,9998 comprovando a linearidade do método (Figura 11). Os valores do LD e LQ foram 0,52 e 1,72 µg/mL, respectivamente, demonstrando a sensibilidade do método.

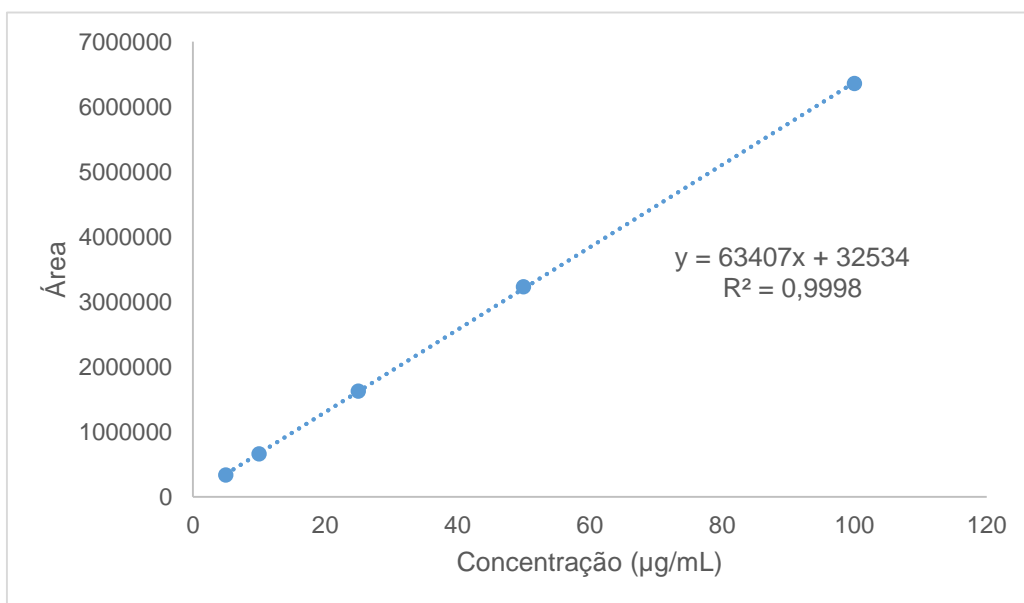


Figura 11. Curva de calibração da R-(-)-carvona (5 – 100 µg/mL).

Os testes de precisão foram avaliados pela repetibilidade (1 e 2) e pela precisão intermediária. A repetibilidade (1) apresentou desvio padrão relativo (DPR) % de 0,74; 0,25 e 0,57 nas análises realizadas nas concentrações de 5, 25 e 100 µg/mL. A repetibilidade (2) obteve um DPR% de 0,18 nas nove análises realizadas com a R-(-)-carvona a 100% da concentração do teste. Os ensaios de precisão intermediária apresentaram DPR% de 0,81 e 0,10 nos dias 1 e 2, respectivamente. Esses resultados podem ser considerados excelentes para procedimentos analíticos, pois apresentaram DPR menores que 1%, demonstrando que o método é preciso.

Os ensaios de exatidão, apresentaram uma exatidão média percentual e DPR% de 98,75 – 0,31; 100,02 – 0,40 e 100,29 – 0,27 nas concentrações de 5 (baixa), 25 (média) e 100 (alta) µg/mL, respectivamente. Esses resultados são considerados adequados para exatidão de métodos analíticos, pois apresentaram

DPR menores que 1% e exatidão média percentual entre 95 – 105% demonstrando que o método é exato. O método desenvolvido apresentou uma robustez adequada, pois as alterações no fluxo da fase móvel e o uso de diferentes colunas analíticas não provocaram variações nos cromatogramas.

5.9 Eficiência de complexação (EC%)

O método analítico desenvolvido por CLAE foi utilizado para determinar a EC% da R-(-)-carvona nos complexos de inclusão com β -CD. A EC% é um parâmetro quantitativo, que indica a quantidade (expressa em porcentagem) de R-(-)-carvona que foi aprisionada no CI com a β -CD. As EC% foram calculadas seguindo a equação (1) (Item 4.5 na página 38) e estão listadas na Tabela 5. A partir dos valores obtidos, foi possível observar que os métodos de CE e LF apresentaram maior EC% (70,93% e 84,26%) este fato pode estar relacionado com uma maior interação da R-(-)-carvona com a β -CD. Resultados semelhantes foram encontrados por Hill e colaboradores (2013) que relataram EC% de aproximadamente 90% para o complexo eugenol/ β -CD preparado por liofilização a baixas temperaturas, como relatado neste estudo.

Tabela 5. Percentuais da eficiência de complexação da MF e dos complexos de R-(-)-carvona/ β -CD.

Amostras	EC% (n = 3)	Média \pm DP
MF	5,87	5,67% \pm 0,19
	5,49	
	5,65	
MA	40,15	40,47% \pm 0,28
	40,68	
	40,58	
CE	70,35	70,93% \pm 0,60
	70,89	
	71,56	
US	39,9	39,78% \pm 0,31
	39,42	
	40,02	
LF	84,38	84,26% \pm 0,33
	84,52	
	83,88	

*DP (desvio padrão)

Kamimura e colaboradores (2014) avaliaram a formação de CIs com carvacrol e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) por diferentes métodos de obtenção através do estudo comparativo de suas propriedades físico-químicas. Os resultados de EC% demonstraram que o método de LF foi melhor (83,74%) para formação de complexos de inclusão com HP- β -CD quando comparado com o método de MA (78,09 %).

Dessa forma, estes resultados corroboram com as análises de DSC, TG/DTG, KF, DRX e MEV discutidos anteriormente, o que pode-se confirmar a formação do CI entre a R-(-)-carvona e a β -CD.

6 CONCLUSÃO

A partir do presente estudo foi possível obter CIs da R-(-)-carvona com a β -CD através dos métodos de MA, CE, US e LF. Uma vez que os resultados evidenciaram uma maior interação entre a R-(-)-carvona e a β -CD nos métodos de CE e LF indicando uma maior capacidade de complexação.

Assim, conclui-se a partir dos resultados de DSC, TG/DTG, KF, FTIR, MEV, DRX e EC% que os métodos de LF e CE apresentaram os melhores perfis de interação hóspede-hospedeiro, sendo estes, uma excelente alternativa para pesquisas futuras no desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, R. L., Rodríguez, F. J., Guarda, A., Galotto, M. J., & Bruna, J. E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food chemistry*, 196, 968-975, 2016.

ABDEL-SHAFI, A. A., Ismail, M. A., & Al-Shihry, S. S. Effect of solvent and encapsulation in β -cyclodextrin on the photophysical properties of 4-[5-(thiophen-2-yl) furan-2-yl] benzamidine. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 316, 52-61, 2016

ADEOSUN, C. B., Olaseinde, S., Opeifa, A. O., & Atolani, O. Essential oil from the stem bark of *Cordia sebestena* scavenges free radicals. *Journal of Acute Medicine*, 3(4), 138-141, 2013.

AMARAL-BAROLI, A., Lago, J. H. G., de Almeida, C. V., de Almeida, M., Scotti, M. T., Leone, G. F., ... & Sartorelli, P. Variability in essential oil composition produced by micropropagated (in vitro), acclimated (ex vitro) and in-field plants of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 86, 180-185, 2016.

ANAYA-EUGENIO, G. D., Rivero-Cruz, I., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. Antinociceptive activity of the essential oil from *Artemisia ludoviciana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016.

ARAÚJO, M.V.G.; MACEDO, F.L.O.; NASCIMENTO, C.C.; CONEGERO, L.S.; BARRETO, L.S.; ALMEIDA, L.E.; COSTA, N.B.; JR, GIMENEZ L.F. Characterization, phase solubility and molecular modeling of β -cyclodextrin/pyrimethamine inclusion complex. *Spectrochim Acta*, 72, 165-170, 2009.

ARUMUGAM, P., Priya, N. G., Subathra, M., & Ramesh, A. Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 26(1), 92-95, 2008.

ASIF, M., Yehya, A. H. S., Al-Mansoub, M. A., Revadigar, V., Ezzat, M. O., Ahamed, M. B. K., ... & Majid, A. M. S. A. Anticancer attributes of Illicium verum essential oils against colon cancer. *South African Journal of Botany*, 103, 156-161, 2016

ATANASOV, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Rollinger, J. M. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614, 2015.

ATARÉS, L., & Chiralt, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 51-62, 2016.

ATASEVER-ARSLAN, B., Yilancioglu, K., Kalkan, Z., Timucin, A. C., Gür, H., Isik, F. B., ... & Cetiner, S. Screening of new antileukemic agents from essential oils of algae extracts and computational modeling of their interactions with intracellular signaling nodes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 120-131, 2016

AUMEERUDDY-ELALFI, Z., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, M. F. Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 103, 89-94, 2016.

AZEREDO, C. M., & Soares, M. J. (Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on Crithidia fasciculata and Trypanosoma cruzi growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(5), 762-768, 2013.

BADREDDINE, B. S., Olfa, E., Samir, D., Hnia, C., & Lahbib, B. J. M. Chemical composition of Rosmarinus and Lavandula essential oils and their insecticidal effects on Orgyia trigotephra (Lepidoptera, Lymantriidae). *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 8(2), 98-103, 2015.

BERTHELOT M, André G Sur l'odeur propre de la terre.. CR Acad Sci 112 (1): 598-599, 1891.

BHAT, M. A., Iqbal, M., Al-Dhfyhan, A., & Shakeel, F. Carvone Schiff base of isoniazid as a novel antitumor agent: Nanoemulsion development and pharmacokinetic evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, 203, 111-119, 2015.

BRADLEY, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with a enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206 –209, 1982.

BUKO, V., Zavodnik, I., Lukivskaya, O., Naruta, E., Palecz, B., Belica-Pacha, S., ... & Abakumov, V. Cytoprotection of pancreatic β -cells and hypoglycemic effect of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: sertraline complex in alloxan-induced diabetic rats. *Chemico-biological interactions*, 244, 105-112, 2016.

CALTABIANO, A. M. Quantitation of sulfobutyl ether- β -cyclodextrin (Captisol™) in Vestipitant IV solution by liquid chromatography with ultraviolet (UV) detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 118, 276-283, 2016.

CASTIGLIONE, K., Fu, Y., Polte, I., Leupold, S., Meo, A., & Weuster-Botz, D. Asymmetric whole-cell bioreduction of (R)-carvone by recombinant Escherichia coli with in situ substrate supply and product removal. *Biochemical Engineering Journal*, 117, 102-111, 2017.

CATALANI, E., Serafini, F. P., Zecchini, S., Picchietti, S., Fausto, A. M., Marcantoni, E., ... & Cervia, D. Natural products from aquatic eukaryotic microorganisms for cancer therapy: Perspectives on anti-tumour properties of ciliate bioactive molecules. *Pharmacological Research*, 113, 409-420, 2016.

CEBORSKA, M., Szwed, K., Asztemborska, M., Wszelaka-Rylik, M., Kicińska, E., & Suwińska, K. Study of β -cyclodextrin inclusion complexes with volatile molecules geraniol and α -terpineol enantiomers in solid state and in solution. *Chemical Physics Letters*, 641, 44-50, 2015.

CERCEAU, C. I., Barbosa, L. C., Filomeno, C. A., Alvarenga, E. S., Demuner, A. J., & Fidencio, P. H. An optimized and validated ^1H NMR method for the quantification of α -pinene in essentials oils. *Talanta*, 150, 97-103, 2016.

CHMURSKI, K., Stepniak, P., & Jurczak, J. Long-chain-linked β -cyclodextrin dimers: Synthesis and relationship between reactivity and inclusion complex formation. *Carbohydrate Polymers*, 138, 8-15, 2016.

CHO, J. H., Kim, Y. I., Kim, D. W., Yousaf, A. M., Kim, J. O., Woo, J. S., ... & Choi, H. G. Development of novel fast-dissolving tacrolimus solid dispersion-loaded prolonged release tablet. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54, 1-7, 2014.

CIOBANU, A., Landy, D., & Fourmentin, S. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. *Food Research International*, 53(1), 110-114, 2013.

CROTEAU, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319, 2000.

CUNHA-FILHO, M. S. S., & Sá-Barreto, L. C. (2007). Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28(1), 1-9.

DA ROCHA, M. L., Oliveira, L. E., Santos, C. C. P., de Sousa, D. P., de Almeida, R. N., & Araújo, D. A. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the monoterpene α , β -epoxy-carvone in mice. *Journal of natural medicines*, 67(4), 743-749., 2013.

DAVIS, M. E., & BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(12), 1023-1035, 2004.

DE ALMEIDA, R. N., de Sousa, D. P., de Farias Nóbrega, F. F., de Sousa Claudino, F., Araújo, D. A. M., Leite, J. R., & Mattei, R. Anticonvulsant effect of a natural compound α , β -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. *Neuroscience letters*, 443(1), 51-55, 2008.

DE SOUSA, B. A., de Morais, S. M., Ferreira, P. A. T., Vieira, Í. G. P., Craveiro, A. A., dos Santos Fontenelle, R. O., ... & de Sousa, H. A. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*, 76, 557-564, 2015.

DE SOUZA Chagas, A. C., de Sena Oliveira, M. C., Giglioti, R., Santana, R. C. M., Bizzo, H. R., Gama, P. E., & Chaves, F. C. M. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2016.

DEL Valle, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, 39(9), 1033-1046, 2004.

DO, T. K. T., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S., & Fernandez, X. Authenticity of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, 146-157, 2015.

DUARTE, A., Luís, Â., Oleastro, M., & Domingues, F. C. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*, 61, 115-122, 2016.

DUNHAM, N.W., MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in mice and rats. *Journal of the American Pharmacists Association*, v. 46, p. 208-209, 1957.

DUTRA, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R., & Calixto, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological research*, 2016.

EL RIES, M. A., Ghany, M. A., Hussin, L. A., El-Anwar, F. M., & Mohamed, A. M. Voltammetric behavior of ketoconazole and its determination in cosmetic preparation using a β -cyclodextrin modified glassy carbon electrode. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 51(1), 49-55, 2013.

ELLOUZE, F.; AMAR, N. B.; DERATANI, E. Les cyclodextrines a large cycle: synthèse, purification, et applications. *Comptes Rendus Chimie*, 14, (10), 967-971, 2011.

EMSERMANN, J., Kahl, U., & Opatz, T. Marine Isonitriles and Their Related Compounds. *Marine Drugs*, 14(1), 16, 2016.

ESFANDYARI-MANESH, M., Ghaedi, Z., Asemi, M., Khanavi, M., Manayi, A., Jamalifar, H., ... & Dinarvand, R. Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research*, 7(4), 290-295, 2013.

FANG, Z., Comino, P. R., & Bhandari, B. Effect of encapsulation of d-limonene on the moisture adsorption property of β -cyclodextrin. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 164-169, 2013.

FARIAS-JUNIOR, P. A., Rios, M. C., Moura, T. A., Almeida, R. P., Alves, P. B., Blank, A. F., ... & Scher, R. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Biological research*, 45(4), 399-402, 2012.

FERNANDES, V. F., Almeida, L. B. D., Feijó, E. V. D. S., Silva, D. D. C., Oliveira, R. A. D., Mielke, M. S., & Costa, L. C. D. B. Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(3), 419-424, 2013.

FIGUEIRAS, A.; SARRAGUÇA, J.M.G.; CARVALHO, R.A.; PAIS, A.A.C.C.; VEIGA, F.J.B. Interaction of omeprazole with a methylated derivative of β -cyclodextrin: phase solubility, NMR spectroscopy and molecular simulation, *Pharm Res.* 24,(2), 377-389, 2007.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. *Flavour and fragrance journal*, 25(3), 112-113, 2010.

GARCÍA, A., Leonardi, D., & Lamas, M. C. Promising applications in drug delivery systems of a novel β -cyclodextrin derivative obtained by green synthesis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(2), 602-608, 2016.

GHAZAGHI, M., Mehri, M., & Bagherzadeh-Kasmani, F. (2014). Effects of dietary *Mentha spicata* on performance, blood metabolites, meat quality and microbial ecosystem of small intestine in growing Japanese quail. *Animal Feed Science and Technology*, 194, 89-98.

GIROLA, N., Figueiredo, C. R., Farias, C. F., Azevedo, R. A., Ferreira, A. K., Teixeira, S. F., ... & Lago, J. H. Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 467(4), 928-934, 2015.

GONG, L., Li, T., Chen, F., Duan, X., Yuan, Y., Zhang, D., & Jiang, Y. An inclusion complex of eugenol into β -cyclodextrin: Preparation, and physicochemical and antifungal characterization. *Food chemistry*, 196, 324-330, 2016.

GONZALEZ, M. S., Lima, B. G., Oliveira, A. F., Nunes, D. D., Fernandes, C. P., Santos, M. G., ... & Feder, D. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(4), 413-418, 2014.

GUIMARÃES, A. G., Oliveira, M. A., dos Santos Alves, R., dos Passos Menezes, P., Serafini, M. R., de Souza Araújo, A. A., ... & Júnior, L. J. Q. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-biological interactions*, 227, 69-76, 2015.

GUO, P., Su, Y., Cheng, Q., Pan, Q., & Li, H. Crystal structure determination of the β -cyclodextrin-p-aminobenzoic acid inclusion complex from powder X-ray diffraction data. *Carbohydrate research*, 346(7), 986-990, 2011.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2016.

HELLIER, P., Al-Haj, L., Talibi, M., Purton, S., & Ladommatos, N. Combustion and emissions characterization of terpenes with a view to their biological production in cyanobacteria. *Fuel*, 111, 670-688, 2013.

HIGUERAS, L., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. Incorporation of hydroxypropyl- β -cyclodextrins into chitosan films to tailor loading capacity for active aroma compound carvacrol. *Food Hydrocolloids*, 43, 603-611, 2015.

HOLLEMAN, A. F, Organic Chemistry, Ed. New York, J. Wiley & sons. New York, 1903.

HUNSKAAR, S. & HOLE, K. The formalin test in mice – dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103-114, 1987.

HZOUNDA, J. B. F., Jazet, P. M. D., Lazar, G., Răducanu, D., Caraman, I., Bassene, E., ... & Lazar, I. M. Spectral and chemometric analyses reveal antioxidant properties of essential oils from four Cameroonian *Ocimum*. *Industrial Crops and Products*, 80, 101-108, 2016.

IANNICELLI, J., Elechosa, M. A., Juárez, M. A., Martínez, A., Bugallo, V., Bandoni, A. L., ... & van Baren, C. M. Effect of polyploidization in the production of essential oils in *Lippia integrifolia*. *Industrial Crops and Products*, 81, 20-29, 2016.

JAMBHEKAR, S. S., & Breen, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug discovery today*, 2015.

JOO, H. E., Lee, H. J., Sohn, E. J., Lee, M. H., Ko, H. S., Jeong, S. J., ... & Kim, S. H. Anti-Diabetic Potential of the Essential Oil of *Pinus koraiensis* Leaves toward Streptozotocin-Treated Mice and HIT-T15 Pancreatic β Cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(10), 1997-2001, 2013.

KAMIMURA, J. A., Santos, E. H., Hill, L. E., & Gomes, C. L. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 701-709, 2014.

KANG, Q., Jiang, C. Y., Fujita, T., & Kumamoto, E. Spontaneous l-glutamate release enhancement in rat substantia gelatinosa neurons by (-)-carvone and (+)-carvone which activate different types of TRP channel. *Biochemical and biophysical research communications*, 459(3), 498-503, 2015.

KFOURY, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention,

controlled release and antiradical activity. *Carbohydrate polymers*, 131, 264-272, 2015.

KFOURY, M., Sahraoui, A. L. H., Bourdon, N., Laruelle, F., Fontaine, J., Auezova, L., ... & Fourmentin, S. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. *Food chemistry*, 196, 518-525, 2016.

KNEZEVIC, P., Aleksic, V., Simin, N., Svircev, E., Petrovic, A., & Mimica-Dukic, N. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant Acinetobacter baumannii. *Journal of ethnopharmacology*, 178, 125-136, 2016.

KORYTKOWSKA-WAŁACH, A., Dubrawska, B., Śmiga-Matuszowicz, M., & Bieg, T. Spectroscopic study on the inclusion complexes of β -cyclodextrin with selected metabolites of catecholamines. *Journal of Molecular Structure*, 1127, 532-538, 2017.

KOWALSKI, R., Sugier, D., Sugier, P., & Kołodziej, B. Evaluation of the chemical composition of essential oils with respect to the maturity of flower heads of Arnica montana L. and Arnica chamissonis Less. cultivated for industry. *Industrial Crops and Products*, 76, 857-865, 2015.

KŘŮMAL, K., Mikuška, P., Večeřová, K., Urban, O., Pallozzi, E., & Večeřa, Z. Wet effluent diffusion denuder: The tool for determination of monoterpenes in forest. *Talanta*, 2015.

LAFHAL, S., Vanloot, P., Bombarda, I., Kister, J., & Dupuy, N. Chemometric analysis of French lavender and lavandin essential oils by near infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 80, 156-164, 2016.

LAPA, A. J., Souccar C, Lima-Landman, M. T. R., Castro, M. A. S., Lima, T. C. Plantas medicinais: métodos de avaliação da atividade farmacológica. São Paulo: SBPN. p 133, 2008.

LIMA, G. F., Alves, G. M. C., dos Santos, F. L. A., de Lima, L. F., Rolim, L. A., & Neto, P. J. R. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. *Rev. Bras. Farm*, 89, 3, 2008

LIN, Y. H. et al. Epoxide as a precursor to secondary organic aerosol formation from isoprene photooxidation in the presence of nitrogen oxides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, n. 17, p. 6718-23, Apr 23 2013.

LIU, B., Zeng, J., Chen, C., Liu, Y., Ma, H., Mo, H., & Liang, G. Interaction of cinnamic acid derivatives with β -cyclodextrin in water: Experimental and molecular modeling studies. *Food chemistry*, 194, 1156-1163, 2016.

LOFTSSON, T., & Brewster, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of pharmaceutical sciences*, 85(10), 1017-1025, 1996.

LUCIARDI, M. C., Blázquez, M. A., Cartagena, E., Bardón, A., & Arena, M. E. Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 373-380, 2016.

LYRA, M. A. M. A., L.D.S.; FONTES, D.A.F.; SOARES SOBRINHO, J.L.; ROLIM NETO P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 31, p. 117-124, 2010.

MA, T. W., Lai, Y., Chen, L. T., & Yang, F. C. The cultivation strategy of enhancing triterpenoid production in submerged cultures of *Antrodia cinnamomea* by adding monoterpenes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 58, 210-218, 2016.

MARQUES, T. H. C., Branco, M. L. B. G. C., Medeiros, J. V. R., Silva, R. O., dos Reis Barbosa, A. L., Lima, T. C., ... & de Freitas, R. M. Cyane-carvone, a Synthetic Derivative of Carvone, Inhibits Inflammatory Response by Reducing Cytokine Production and Oxidative Stress and Shows Antinociceptive Effect in Mice. *Inflammation*, 37(3), 966-977, 2014.

MARRETO, R. N., Almeida, E. E. C. V., Alves, P. B., Niculau, E. S., Nunes, R. S., Matos, C. R. S., Araújo, A. A. S. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochimica Acta*, 475, 53-58, 2008.

MAVRIDIS, I. M., & Yannakopoulou, K. Anionic cyclodextrins as versatile hosts for pharmaceutical nanotechnology: Synthesis, drug delivery, enantioselectivity, contrast agents for MRI. *International journal of pharmaceutics*, 492(1), 275-290, 2015.

MELANI, F., Pasquini, B., Caprini, C., Gotti, R., Orlandini, S., & Furlanetto, S. Combination of capillary electrophoresis, molecular modeling and NMR to study the enantioselective complexation of sulpiride with double cyclodextrin systems. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 114, 265-271, 2015.

MENEZES, P. P., dos Santos, P. B. P., Dória, G. A. A., de Sousa, B. M. H., Serafini, M. R., Nunes, P. S., ... & Júnior, F. J. B. M. (Molecular modeling and physicochemical properties of supramolecular complexes of limonene with α - and β -cyclodextrins. *AAPS PharmSciTech*, 18(1), 49-57, 2016.

MENEZES, P. P., Serafini, M. R., Santana, B. V., Nunes, R. S., Santos, M. R. V., Quintans-Junior, L. J., Silva, G. F.; Medeiros, I. A., Marchioro, M., Araújo, A. A. S. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochimica Acta* (Print), v. 548, p. 45, 2012.

MENEZES, P. P., P., A de S Araujo, A., Doria, A. A., J Quintans-Junior, L., GB de Oliveira, M., RV dos Santos, M., ... & L de Matos, I. Physicochemical characterization and analgesic effect of inclusion complexes of essential oil from *Hyptis pectinata* L. Poit leaves with β -cyclodextrin. *Current pharmaceutical biotechnology*, 16(5), 440-450, 2015.

MENEZES, P. P., Serafini, M. R., Quintans-Júnior, L. J., Silva, G. F., Oliveira, J. F., Carvalho, F. M. S., Souza, J. C. C., Matos, J. R., Alves, P. B.; Matos, I. L.; Hădărugă, D. I., Araújo, A. A. S. Inclusion complex of (-)-linalool and β -cyclodextrin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 115, p. 2429-2437, 2014.

MENEZES, P. P.; DÓRIA, G. A. A.; ARAÚJO, A. A. S; SOUSA, B. M. H; QUINTANSJÚNIOR, L. J.; LIMA, R. N.; ALVES, P. B.; CARVALHO, F. M. S.; BEZERRA, D. P.; MENDONÇA-JÚNIOR, F. J. B.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; SILVA, G. F.; AQUINO, T. M.; SABINO, A. R.; EGITO, E. S. T.; SERAFINI, M. R.. Docking and physicochemical properties of α - and β -cyclodextrin complex containing isopulegol: a comparative study. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, p. 1-14, 2016.

MICHALSKA, P., Wojnicz, A., Ruiz-Nuño, A., Abril, S., Buendia, I., & León, R. Inclusion complex of ITH12674 with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation, physical characterization and pharmacological effect. *Carbohydrate Polymers*, 157, 94-104, 2017.

Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006

MONTEIL, M., Lecouvey, M., Landy, D., Ruellan, S., & Mallard, I. Cyclodextrins: A promising drug delivery vehicle for bisphosphonate. *Carbohydrate Polymers*, 156, 285-293, 2017.

MORA, S., Díaz-Véliz, G., Millán, R., Lungenstrass, H., Quirós, S., Coto-Morales, T., & Hellión-Ibarrola, M. C. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 82(2), 373-378, 2005.

MORIWAKI, C., Mangolim, C. S., Ruiz, G. B., de Moraes, G. R., Baesso, M. L., & Matioli, G. Biosynthesis of CGTase by immobilized alkalophilic bacilli and crystallization of beta-cyclodextrin: Effective techniques to investigate cell immobilization and the production of cyclodextrins. *Biochemical Engineering Journal*, 83, 22-32, 2014.

MOUSSAOUI, F., & Alaoui, T. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 32-37, 2016.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.113, p. 226–238, 2014.

MURUGANATHAN, U., & SRINIVASAN, S. Beneficial effect of carvone, a dietary monoterpene ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 1558-1567, 2016.

NARCHIA P. b, Neplokhc V., Piazzac V., Beardad T., Baylec T., Foldynab M., Toccafondib C., Prod'hommea p., Tchernychevac M., Cabarrocasb P. R. Surface potential investigation on interdigitated back contact solar cells by Scanning Electron Microscopy and Kelvin Probe Force Microscopy: Effect of electrical bias. *Solar Energy Materials & Solar Cells*. Vol. 161. 263–269, 2017.

NIKOLIĆ, B., Vasiljević, B., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., & Knežević-Vukčević, J. Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells. *Chemico-biological interactions*, 242, 263-271, 2015.

NOGOCEKE, F. P., Barcaro, I. M., de Sousa, D. P., & Andreatini, R. Antimanic-like effects of (R)-(-)-carvone and (S)-(+)-carvone in mice. *Neuroscience letters*, 619, 43-48, 2016.

OKUNIEWSKI, M., Paduszyński, K., & Domańska, U. Solid+ liquid) equilibrium phase diagrams in binary mixtures containing terpenes: New experimental data and analysis of several modelling strategies with modified UNIFAC (Dortmund) and PC-SAFT equation of state. *Fluid Phase Equilibria*, 2016.

OLESEN, N. E., Vana, V., Holm, R. Does the Digestibility of Cyclodextrins Influence the *In Vivo* Absorption of Benzo[a]pyrene in Rats?. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1-5, 2016.

OLIVEIRA, M. G., Brito, R. G., Santos, P. L., Araújo-Filho, H. G., Quintans, J. S., Menezes, P. P., ... & Scotti, L. α -Terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with

β -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. *Chemico-biological interactions*, 254, 54-62, 2016.

OLIVEIRA, M. G., Brito, R. G., Santos, P. L., Araújo-Filho, H. G., Quintans, J. S., Menezes, P. P., ... & Scotti, L. α -Terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with β -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. *Chemico-biological interactions*, 254, 54-62, 2016.

PANG, X., Xu, C., Jiang, Y., Xiao, Q., & Leung, A. W. Natural products in the discovery of novel sonosensitizers. *Pharmacology & therapeut*, 2015.

PATEL, A., Pandey, V., & Patra, D. D. Metal absorption properties of *Mentha spicata* grown under tannery sludge amended soil-its effect on antioxidant system and oil quality. *Chemosphere*, 147, 67-73, 2016.

PEARSON, W., Fletcher, R. S., Kott, L. S., & Hurtig, M. B. Protection against LPS-induced cartilage inflammation and degradation provided by a biological extract of *Mentha spicata*. *BMC complementary and alternative medicine*, 10(1), 1, 2010.

PEIXOTO, M. G., Costa-Júnior, L. M., Blank, A. F., da Silva Lima, A., Menezes, T. S. A., de Alexandria Santos, D., ... & de Fátima Arrigoni-Blank, M. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary parasitology*, 210(1), 118-122, 2015.

PEREIRA, Á. I. S., Pereira, A. D. G. S., Sobrinho, L., Palma, O., Cantanhede, E. D. K. P., & Siqueira, L. F. S. Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. *Educación química*, 25(4), 446-449, 2014.

PERIASAMY, R. et al. Spectral investigation and characterization of host-guest inclusion complex of 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) with beta-cyclodextrin. *Carbohydr Polym*, v. 114, p. 558-66, Dec 19 2014.

PERIASAMY, R.; RAJAMOHAN, R.; KOTHAINAYAKI, S.; SIVAKUMAR, K. Spectral investigation and structural characterization of Dibenzalacetone: β -Cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Molecular Structure*, 1068, 155-163, 2014.

PINTO, L. M., Fraceto, L. F., Santana, M. H. A., Pertinhez, T. A., Junior, S. O., & de Paula, E. Physico-chemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 39(5), 956-963, 2005.

PORTO, C., Stüker, C. Z., Mallmann, A. S., Simionatto, E., Flach, A., Canto-Dorow, T. D., ... & Morel, A. F. (R)-(-)-carvone and (1R, 4R)-trans-(+)-dihydrocarvone from *Poirertia latifolia* Vogel. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(5), 782-786, 2010.

PRAGADHEESH, V. S., Yadav, A., & Chanotiya, C. S. Role of substituents in cyclodextrin derivatives for enantioselective gas chromatographic separation of chiral terpenoids in the essential oils of *Mentha spicata*. *Journal of Chromatography B*, 1002, 30-41, 2015.

PUTIGNANI, L., Massa, O., & Alisi, A. Engineered *Escherichia coli* as new source of flavonoids and terpenoids. *Food Research International*, 54(1), 1084-1095, 2013.

RAKMAI, J., & Cheirsilp, B. Continuous production of β -cyclodextrin by cyclodextrin glycosyltransferase immobilized in mixed gel beads: Comparative study in continuous stirred tank reactor and packed bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 107-113, 2016.

ROMÁN, L., Dura, Á., Martínez, M. M., Rosell, C. M., & Gómez, M. Combination of extrusion and cyclodextrin glucanotransferase treatment to modify wheat flours functionality. *Food Chemistry*, 199, 287-295, 2016.

SANTOS, E. H., Kamimura, J. A., Hill, L. E., & Gomes, C. L. Characterization of carvacrol β -cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 583-592, 2015.

SANTOS, F. A., Serra, C. G., Bezerra, R. J., Figueredo, F. G., Matias, F. F., Menezes, I. R., ... & Coutinho, H. D. Antibacterial activity of *Plectranthus amboinicus* Lour (Lamiaceae) essential oil against *Streptococcus mutans*. *European Journal of Integrative Medicine*, 2015.

SANTOS, P. L., Brito, R. G., Oliveira, M. A., Quintans, J. S., Guimarães, A. G., Santos, M. R., ... & Araújo, A. A. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. *Phytomedicine*, 2016.

SARMENTO-NETO, J. F., do Nascimento, L. G., Felipe, C. F. B., & de Sousa, D. P. Analgesic Potential of Essential Oils. *Molecules*, 21(1), 20, 2015.

SAWATDEE, S., Hiranphan, P., Laphanayos, K., & Srichana, T. Evaluation of sildenafil pressurized metered dose inhalers as a vasodilator in umbilical blood vessels of chicken egg embryos. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(1), 90-97, 2014.

SERAFINI, M. R., Menezes, P. P., Costa, L. P., Lima, C. M., Quintans, L. J., Cardoso, J. C., Matos, J. R., Soares-Sobrinho, J. L., Grangeiro, S., Nunes, P. S., Bonjadim, L. R., Araújo, A. A. S. Interaction of p-cymene with β -cyclodextrin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2011.

SHAHBAZI, Y. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. *Journal of pathogens*, 2015a.

SHAHBAZI, Y., & Shavisi, N. Interactions of *Ziziphora clinopodioides* and *Mentha spicata* essential oils with chitosan and ciprofloxacin against common food-related pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 364-369, 2016.

SHAHBAZI, Y., & Shavisi, N. Interactions of *Ziziphora clinopodioides* and *Mentha spicata* essential oils with chitosan and ciprofloxacin against common food-related pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 364-369, 2016b.

SHI, Y. H., Zhu, S., Ge, Y. W., He, Y. M., Kazuma, K., Wang, Z., ... & Komatsu, K. (Monoterpene derivatives with anti-allergic activity from red peony root, the root of *Paeonia lactiflora*. *Fitoterapia*, 108, 55-61, 2016.

SIQUEIRA-LIMA, P.S.; ARAÚJO, A.A.S.; LUCCHESI, A.M.; QUINTANS, J.S.S.; MENEZES, P.P.; ALVES, P.B.; LUCCA JÚNIOR, W.; SANTOS, M.R.V.; BONJARDIM, L.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. β -Cyclodextrin Complex Containing *Lippia grata* Leaf Essential Oil Reduces Orofacial Nociception in Mice – Evidence of Possible Involvement of Descending Inhibitory Pain Modulation Pathway. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 114, (2), 188-196, 2014.

SOUZA, F. V. M., da Rocha, M. B., de Souza, D. P., & Marçal, R. M. (-)-Carvone: Antispasmodic effect and mode of action. *Fitoterapia*, 85, 20-24, 2013.

STEFANAKI, A., Cook, C. M., Lanaras, T., & Kokkini, S. (The Oregano plants of Chios Island (Greece): Essential oils of *Origanum onites* L. growing wild in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 82, 107-113, 2016.

STELLA, V. J., & HE, Q. Cyclodextrins. *Toxicologic pathology*, 36(1), 30-42, 2008.

SU, J. et al. Preparation of natural borneol/2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex and its effect on the absorption of tetramethylpyrazine phosphate in mouse. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, v. 60, n. 6, p. 736-42, 2012.

TAN, X. C., Chua, K. H., Ram, M. R., & Kuppusamy, U. R. Monoterpenes: Novel insights into their biological effects and roles on glucose uptake and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Food chemistry*, 196, 242-250, 2016.

TANG, E. L., Rajarajeswaran, J., Fung, S. Y., & Kanthimathi, M. S. Antioxidant activity of *Coriandrum sativum* and protection against DNA damage and cancer cell migration. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 347, 2013.

ULUKANLI, Z., Karabörklü, S., Bozok, F., Burhan, A. T. E. S., Erdogan, S., Cenet, M., & KARAASLAN, M. G. Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils. *Chinese journal of natural medicines*, 12(12), 901-910, 2014.

VALCOURT, C., Saulnier, P., Umerska, A., Zanelli, M. P., Montagu, A., Rossines, E., & Joly-Guillou, M. L. Synergistic interactions between doxycycline and terpenic components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against gram negative bacteria. *International journal of pharmaceutics*, 498(1), 23-31, 2016.

VECSERNYÉS, Miklós, et al. "Cyclodextrins, blood–brain barrier, and treatment of neurological diseases." *Archives of medical research* 45.8 (2014): 711-729, 2014.

VERMA, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113, 2015.

VILLIERS, A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend. Acad. Sci*, 112, 536-538, 1891.

WANG, J., Cao, Y., Sun, B., & Wang, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chemistry*, 127(4), 1680-1685, 2011.

WATANABE, C. H., Nosse, T. M., Garcia, C. A., & PINHEIRO, P. N. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. *Rev. Bras. Pl. Med*, 8(4), 76-86, 2006.

WINTER, C. A., Risley, E. A., Nuss, G. W. Carrageenin-induced edemas in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol* 111: 544-547, 1962.

WU, Y. H. Naturally derived anti-hepatitis B virus agents and their mechanism of action. *World journal of gastroenterology*, 22(1), 188, 2016.

XIAO, Z., Fan, B., Niu, Y., Wu, M., Liu, J., & Ma, S. Characterization of odor-active compounds of various *Chrysanthemum* essential oils by gas chromatography–olfactometry, gas chromatography–mass spectrometry and their correlation with sensory attributes. *Journal of Chromatography B*, 1009, 152-162, 2016.

YAMADA, Y., Kuzuyama, T., Komatsu, M., Shin-ya, K., Omura, S., Cane, D. E., & Ikeda, H. Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), 857-862, 2015.

YAMANOI, T., Oda, Y., Katsuraya, K., Inazu, T., & Hattori, K. Synthesis, structure, and evaluation of a β -cyclodextrin-artificial carbohydrate conjugate for use as a doxorubicin-carrying molecule. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2015.

YULIANI, S., Torley, P. J., D'Arcy, B., Nicholson, T., & Bhandari, B. Extrusion of mixtures of starch and d-limonene encapsulated with β -cyclodextrin: Flavour retention and physical properties. *Food Research International*, 39(3), 318-331, 2006.

ZENG, Q. H., Zhao, J. B., Wang, J. J., Zhang, X. W., & Jiang, J. G. . Comparative extraction processes, volatile compounds analysis and antioxidant activities of essential oils from *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC and *Cirsium setosum* (Willd.) M. Bieb. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 595-605, 2016.